

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA



**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS DIFERENCIAS
ENTRE LOS EXOSOMAS AISLADOS EN EL LAVADO
BRONCOALVEOLAR Y PLASMA DE PACIENTES CON
CÁNCER DE PULMÓN AVANZADO Y PACIENTES CON
PATOLOGÍA NO TUMORAL**

TESIS DOCTORAL

ANA LÓPEZ ALFONSO

MADRID 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



***Estudio y caracterización de las diferencias entre los
exosomas aislados en el lavado broncoalveolar y plasma
de pacientes con cáncer de pulmón avanzado y pacientes
con patología no tumoral***

MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA

Ana López Alfonso

Licenciada en Medicina,
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

Directores de Tesis

Dr. Félix Bonilla Velasco
Dra. Vanesa García Barberán

Tutor de Tesis

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Madrid, 2016

Universida Autónoma de Madrid

Portada: Micrografía electrónica de transmisión de exosomas extraída de “Exosomes and tumor growth” de Clotilde Théry. Insitute Curie in Paris, France

EL Dr. FÉLIX BONILLA VELASCO, DOCTOR EN MEDICINA Y ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA Y LA Dra. VANESA GARCÍA BARBERÁN, DOCTORA E INVESTIGADORA CONTRATADA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL CLÍNICO DE SAN CARLOS.

CERTIFICAN: Que Doña ANA LÓPEZ ALFONSO, DNI 50863066S, Licenciada en Medicina, especialista en Oncología Médica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS EXOSOMAS AISLADOS EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR Y PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN AVANZADO Y PACIENTES CON PATOLOGÍA NO TUMORAL”, y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser presentado y sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente para optar al GRADO DE DOCTORA por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expiden el presente certificado en Madrid a 30 de Mayo de 2016.

Dr: Félix Bonilla Velasco
Director de Tesis

Dra. Vanesa García Barberán
Directora de Tesis

Dra. Gemma Domínguez Muñoz
Tutora

Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo se ha realizado en colaboración con los Servicios de Oncología Médica y de Neumología del Hospital Universitario Infanta Leonor y el grupo de Mecanismos Moleculares del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro y ha contado con el soporte de las siguientes entidades SAF2010-20750, RD12/0036/0041, Fundación Santander, Fundación AECC y CM: S/BMD-234

*A mi marido, amigo y compañero Eduardo, por haber recorrido océanos de tiempo, gracias
por tu extraordinaria bondad y compartir tus días a mi lado.*

A Inés y Diego porque sois el motor de mi vida.

*A mis padres, por enseñarme las bases necesarias para
ser una buena persona.*

***“Si he visto un poco más lejos,
es porque estaba subido a hombros de gigantes”***

Isaac Newton. 1676

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Félix Bonilla y Dra. Vanesa García, por su apoyo, ayuda y paciencia corrigiendo este trabajo, sin ellos no hubiese visto la luz. Agradezco a la Dra. Gemma Domínguez su ayuda como tutora de esta Tesis.

Les agradezco la oportunidad que me han brindado de trabajar en investigación básica frente al cáncer, así como el interés que han mostrado por mi formación científica. Me siento afortunada por haber podido trabajar y aprender de estos grandes profesionales y sobre todo grandes personas, que han sabido transmitirme parte de su espíritu crítico y de superación.

Mi reconocimiento a todos los compañeros del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Infanta Leonor y el grupo de Mecanismos Moleculares del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, que han realizado aportaciones y ayuda inestimable en este proyecto. Gracias por estar dispuestos a ayudar y colaborar en todo momento.

Y muy especialmente, a todos aquellos que simplemente han estado ahí en los momentos más difíciles, pues sin su apoyo este trabajo jamás hubiese visto la luz.

Gracias a todos mis compañeros de profesión, en especial al Servicio de Oncología del Hospital Universitario Infanta Leonor, que día a día me enseñan y ayudan a tratar con el reto más difícil de toda mi carrera: el enfermo. Espero poder devolveros todo el cariño que desinteresadamente me habéis regalado.

SUMMARY

This original work analyzes the presence and role of the exosomes and their content, isolated from the bronchoalveolar lavage (BAL) and from plasma of patients suffering from lung carcinoma (LC). It also includes the comparative study of the same material in patients with other respiratory pathologies but not lung cancer (NLC).

Lung cancer is one of the principal causes of death in the world. Despite advances in treatment and early detection, from the moment of diagnosis the prognosis is very bad.

Exosomes are nanovesicles measuring between 40 and 100 nm liberated by the cells as a result of differing stimuli. In biology there are various types of nanovesicles whose structure and function are different from those of the exosomes. This fact, together with the different functions of exosomes led us to study them and their implication in pulmonary carcinoma, analysing the mechanisms of the exosomes involved in the progression of this neoplasia.

To achieve this, we developed a novel method of isolating the exosomes in BAL samples. Their presence in this medium was little known and studied. This was an essential first part in our study.

The study was carried out with a series of 101 patients who, for clinical reasons, were subjected to a diagnostic fibrobronchoscopy. 105 BAL samples were collected, thereby ensuring the validity of the study, and from these the exosomes were extracted. Venous blood samples were also taken from the same patient from which the plasma was separated and the exosomes isolated.

The exosomes in both the plasma and the BAL of patients, both LC and NLC, were measured. The measurements were quantified by acetylcholinesterase activity and characterized by Western Blot, Electron Microscopy and Nanoparticle Tracking Analysis.

A greater number of exosomes, statistically significant, were detected in the plasma than in the BAL. In both samples a greater number of exosomes were detected in LC patients than in NLC patients.

The genetic material of the exosomes was analyzed, extracting the miRNAs of the exosomes of the plasma and the BAL of both LC and NLP patients. An analysis of the expression profiles of the miRNAs was carried out as well as individual validation in a control group.

According to the study a greater concentration of exosomal miRNAs was observed in LC than in NLC patients, both in plasma and in BAL. Among the miRNAs most frequently found in all the samples those isolated from BAL exosomes of both types of patients showed a high degree of similarity. The highest number of miRNAs were detected in the plasma exosomes of LC patients.

An analysis of the protein content in the exosomic interior was carried out in a similar way to the extraction of miRNAs. The cytokine which was most observed in the different populations was TGF2 α ; no difference in expression was found either in patient type or in the source of the sample.

The concentrations of exosomes and of miRNAs correlated with clinical pathological parameters and with the overall survival rates of both patients types. No significant relationship was found with any variable.

With this study, therefore, the presence of exosomes in the BAL of LC patients has been described for the first time and a new method of extraction has been developed. The results show a higher level of exosomes in both the plasma and the BAL of LC patients. In both patients types the results also show a greater concentration of miRNAs and cytokines in the exosomes isolated in the plasma compared with those in the BAL. These findings may indicate a greater exosomal secretion activity in the pathology of tumours and the role of plasma as a vehicle for this genetic material. This is likely to be involved in paracrine communication which promotes the progression of tumours.

We believe that this study brings original data to the area of intercellular communication in cases of lung cancer via nanovesicles. This demonstrates a process of selection in the manner of secretion and a different specificity with respect to the content within the cells of the nanovesicles.

RESUMEN

El presente trabajo original analiza la presencia y papel de los exosomas y su contenido, aislados del lavado broncoalveolar (LBA) y del plasma de pacientes afectados de cáncer de pulmón (CP) y el estudio comparativo con el mismo material de pacientes con otras patologías respiratorias no cáncer de pulmón (NCP).

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de los avances producidos en su tratamiento y detección precoz, su pronóstico es sombrío desde el momento del diagnóstico.

Los exosomas son nanovesículas de 40 a 100 nm liberadas por las células ante diferentes estímulos. Se conocen en biología distintos tipos de microvesículas cuya estructura y función son diferentes al de los exosomas. Este hecho y las diferentes funciones desarrolladas por los exosomas, nos llevó a trabajar en su conocimiento e implicación en el carcinoma de pulmón, analizando los mecanismos dependientes de los exosomas relacionados con la progresión de esta neoplasia.

Para su ejecución, desarrollamos un método novedoso de aislamiento de exosomas de muestras de LBA, cuya presencia en este medio era poco conocida y estudiada, permitiéndonos su obtención como primer paso imprescindible del estudio.

El estudio se llevó a cabo en una serie de 105 pacientes que fueron sometidos por causas clínicas a una fibrobroncoscopia diagnóstica. Se coleccionaron 105 muestras de LBA, que conformaron la casuística del estudio, aislándose los exosomas de los mismos. También se dispuso de una muestra de sangre periférica de los mismos pacientes, de las que se separó el plasma y en estos se aislaron igualmente los exosomas.

Se cuantificaron los exosomas en plasma y LBA de pacientes con CP y NCP. Se cuantificaron mediante el método de la Acetilcolinesterasa y un equipo Nanosight, y se visualizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopia Confocal.

Se detectó una mayor cantidad, estadísticamente significativa, de exosomas en plasma que en LBA. En pacientes con CP se detectó más alta presencia de exosomas que en pacientes con NCP en ambas muestras. Se analizó el material genético extrayéndose los

miRNAs de los exosomas de plasma y de LBA de pacientes con CP y con NCP. Se llevó a cabo un análisis de perfiles de expresión de miRNAs así como una validación individual en una serie externa.

Tras el estudio, se objetivó una mayor concentración de miRNAs exosomales en pacientes con CP, tanto en plasma como en LBA, que en pacientes NCP. Entre los miRNAs más frecuentemente representados en todas las muestras, los aislados de exosomas de LBA de ambos tipos de enfermos, tenían un mayor grado de similitud. La tasa más elevada de miRNAs se detectó en exosomas de plasma de pacientes con CP.

Se realizó de forma similar a la extracción de miRNAs, un análisis de contenido proteico en el interior exosómico. La citoquina más expresada en las diferentes poblaciones fue la TGF2 α , sin encontrar ninguna diferencia en su expresión según el tipo de paciente o la procedencia de la muestra. Las concentraciones de exosomas y de miRNAs exosomales se correlacionaron con parámetros clínico-patológicos y con supervivencia global de ambos tipos de pacientes sin encontrar una relación significativa con ninguna variable.

Con este trabajo, por tanto, se ha descrito por primera vez la presencia de exosomas en LBA de pacientes con CP y se ha desarrollado un nuevo método de extracción. Los resultados revelan una más alta tasa de exosomas tanto en plasma como en LBA en pacientes con CP, y una mayor concentración de miRNAs y citoquinas en los exosomas aislados de plasma respecto de los de LBA en ambos tipos de pacientes. Estos hallazgos podrían indicar una mayor actividad secretora exosomal en patología tumoral y la utilización del plasma para vehiculizar este material genético, previsiblemente implicado en vías paracrinas que promuevan la progresión tumoral.

Consideramos que con este estudio hemos aportado datos originales en el campo de la comunicación intercelular en cáncer de pulmón mediada por nanovesículas, poniendo de manifiesto una selectividad en la vía de secreción y una diferente especificidad respecto del contenido empaquetado por las células en las nanovesículas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AchE: Acetilcolinesterasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ARNm: ARN mensajero

ACh: Acetilcolina

BAL: Bronchoalveolar Lavage

BAS: Broncoaspirado

BchE: Butirilcolinesterasa

BDFN: Factor neutrofílico derivado del cerebro

BF: Broncoscopio Flexible

BPT: Biopsia Pulmonar Transbronquial

BR: Broncoscopio Rígido

CDDP: Cisplatino

CDK: Quinasas dependientes de ciclinas

CDKIs: Inhibidores del complejo ciclina-quinasa dependiente

CDS: Secuencia codificante

CMP: Carcinoma Microcítico de Pulmón

CP: Cáncer de Pulmón

CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico

DTT: Ditioneitol

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermoide

EPID: Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas

ESCRT: Complejos clasificadores endosomales responsables del transporte

FBC: Fibrobroncoscopia

FITC: Isocianato de fluoresceína

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática

GDFN: Factor neutrofílico derivado de la glía

HRP: Horseradish peroxidase

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

ILVs: Cuerpos Intraluminales

LBA: Lavado Broncoalveolar
LBPA: Ácido Lisobifosfatídico
LC: Lung Cancer
LLC: Leucemia Linfática Crónica
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
miARN: Micro Ácido Ribonucleico
MVBS: Cuerpos multivesiculares
NCP: No Cáncer de Pulmón
NLC: Not Lung Cancer
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMN: Polimorfonucleares
Pri-miARN: microARN primario
PVDF: Polifluoruro de vinilideno
QT: Quimioterapia
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RT: Radioterapia
SDS: Dodecilsulfato sódico
SPN: Síndromes Paraneoplásicos
SPSS: Statistical Package for Social Science SPSS
TAC: Tomografía Axial Computerizada
Tpl: Plasma de pacientes con cáncer de pulmón
Tbal: Lavado Broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón
NTpla: Plasma de pacientes sin cáncer de pulmón
NTbal: Lavado Broncoalveolar de pacientes sin cáncer de pulmón
TNM: Estadificación del Cáncer de Pulmón
UICC: International Union Against Cancer
UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer
VEGF: Factor estimulante del crecimiento endotelial
VPP: Valor Predictivo Positivo

ÍNDICE

	INTRODUCCIÓN	29
1.	Cáncer de pulmón	31
1.1.	Generalidades	31
1.2.	Importancia demográfica del cáncer de pulmón	32
1.3.	Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón	35
1.3.1.	Nuevas modalidades de detección precoz: Biomarcadores en la detección precoz	38
1.3.1.1.	Biomarcadores en sangre	40
1.4.	Breve recuerdo clínico	40
1.4.1.	Manifestaciones relacionadas con la localización del tumor primario	41
1.4.2.	Manifestaciones relacionadas con la extensión locorregional intratorácica	42
1.4.3.	Manifestaciones de la enfermedad a distancia	43
1.5.	Clasificación histológica	44
1.5.1.	Carcinoma de células pequeñas o carcinoma microcítico	45
1.5.2.	Carcinoma epidermoide	46
1.5.3.	Adenocarcinoma	47
1.5.4.	Carcinoma de células grandes	48
1.5.5.	Carcinoma adenoescamoso	48
1.5.6.	Carcinoma sarcomatoide	49
1.5.7.	Tumor carcinoide	49
1.5.8.	Tumores de tipo glándula salival	49
1.5.9.	Tumores mesenquimales	49
1.6.	Clasificación molecular del Cáncer de Pulmón	49
1.7.	Estadificación del Cáncer de Pulmón	52
2.	Técnicas diagnósticas en patología pulmonar	53
2.1.	Broncoscopia	53
2.1.1.	Técnica de la broncoscopia	55
2.1.2.	Técnicas de obtención de muestras endoscópicas	56
2.2.	Lavado broncoalveolar	58
2.2.1.	Técnica de realización	59
2.2.2.	Técnicas de LBA protegido	60

3.	Patologías pulmonares prevalentes	66
3.1.	Neumopatías intersticiales difusas no infecciosas	66
3.2.	Patología pleural y mediastínica	67
3.3.	Hemorragia alveolar	67
3.4.	Fibrosis pulmonar idiopática	68
3.5.	Bronquiectasias	69
3.6.	Sarcoidosis	69
3.7.	Infecciones pulmonares	69
4.	Biología del crecimiento y diseminación tumoral	71
4.1.	Ciclo celular	71
4.2.	Carcinogénesis del cáncer de pulmón	76
4.3.	Alteraciones genético-moleculares en cáncer de pulmón	77
4.3.1.	Alteraciones genéticas en componentes del ciclo celular: genes supresores de tumores	77
4.3.2.	Alteraciones genéticas en vías de transducción de señales bioquímicas: oncogenes	79
4.3.3.	Alteraciones genéticas en componentes del ciclo celular: cambios epigenéticos	81
5.	Ácidos nucleicos extracelulares en plasma	84
5.1.	MicroARNs circulantes en plasma	87
6.	Exosomas	91
6.1.	Definición y características de los exosomas	91
6.2.	Biogénesis de los exosomas	93
6.3.	Secreción de exosomas al espacio extracelular	96
6.4.	Composición molecular de los exosomas	98
6.4.1.	Lípidos	98
6.4.2.	Proteínas	99
6.4.3.	Material genético: ARN y DNA	101
6.5.	Función de los exosomas	102
6.5.1.	Exosomas en la comunicación intercelular	103
6.5.2.	Exosomas como facilitadores de la respuesta inmune	103
6.5.3.	Exosomas como mediadores de la respuesta inflamatoria	104
6.5.4.	Papel en la transferencia de agentes infecciosos a células diana	104

6.5.5.	Papel en el intercambio de proteínas patógenas	104
6.5.6.	Papel en procesos biológicos como la fertilización y el desarrollo embrionario	105
6.5.7.	Papel en la reparación y crecimiento de tejidos	105
6.6.	Exosomas y cáncer	105
	OBJETIVOS	109
	MATERIALES Y MÉTODOS	113
7.	Selección de pacientes y muestras	115
7.1.	Selección de los pacientes	115
7.2.	Selección de las muestras	115
8.	Características clínico-patológicas de los pacientes	117
9.	Seguimiento clínico y tratamiento	122
9.1.	Aislamiento de exosomas a partir del plasma y del Lba de pacientes	123
9.1.1.	Aislamiento de exosomas a partir del plasma de los pacientes	123
9.1.2.	Aislamiento de exosomas a partir del LBA de los pacientes	124
9.2.	Cuantificación de los exosomas aislados del plasma y del LBA	124
9.2.1.	Método de la Actividad Acetilcolinesterasa (AChE)	124
9.2.2.	NanoSight	125
9.3.	Identificación de los exosomas aislados del plasma y del LBA	126
9.3.1.	Visualización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión	126
9.3.2.	Unión de los exosomas a microesferas conjugadas con el anticuerpo específico de exosomas CD63. Visualización mediante Microscopía Confocal	127
9.4.	Extracción de proteínas y análisis por inmuno-transferencia	130
9.5.	Extracción de miARN	134
9.6.	Retrotranscripción	135
9.7.	Análisis de los perfiles de expresión de los miarn en las muestras agrupadas. Cuantificación a tiempo real en la serie de validación	136
9.8.	Array de proteínas (Citoquinas)	143
9.9.	Análisis de las funciones de los miARNS contenidos en los exosomas	146
9.10.	Análisis estadístico	147

	RESULTADOS	149
10.	Caracterización de los exosomas aislados en plasma y en LBA de pacientes con CP y de pacientes con patología no tumoral	151
10.1.	Visualización de los exosomas de plasma y LBA mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal	152
10.2.	Análisis del tamaño y cuantificación de las nanovesículas aisladas del plasma y LBA mediante la tecnología NanoSight.	154
10.3.	Detección de proteínas específicas de exosomas mediante inmunotransferencia en los exosomas aislados de Plasma y LBA	159
11.	Cuantificación de los exosomas aislados en plasma y en LBA en pacientes con CP y en pacientes con patología no tumoral. evaluación de niveles de acetilcolinesterasa	161
12.	Perfiles de expresión de miARNs contenidos en exosomas de plasma y LBA en muestras agrupadas de pacientes con CP y en pacientes con patología no tumoral	164
12.1.	Número de miARNs detectados en las series definidas	164
12.2.	miARNs específicos en función del tipo de paciente y del tipo de muestra. Funciones afectadas por los mismos	165
12.3.	miARNs con mayores niveles detectados en las distintas poblaciones definidas. Funciones relacionadas con los mismos	167
12.4.	Estudio de los miARNs desregulados en las muestras agrupadas en función del tipo de población y del tipo de muestra.	171
12.5.	Análisis de las funciones afectadas por los miARNs desregulados contenidos en los exosomas aislados en los subgrupos analizados	178
13.	Evaluación de los niveles de los miARNs más desregulados en las muestras agrupadas en una serie de validación	182
14.	Resultado del análisis de expresión de citoquinas en los exosomas de plasma y LBA en las muestras agrupadas de pacientes con CP y en pacientes con patología no tumoral	184
14.1.	Análisis de las citoquinas presentes en los exosomas del plasma y LBA en las muestras determinadas	184
14.2.	Comparación de los niveles de las citoquinas presentes en los exosomas aislados de los distintos tipos de pacientes y tipos de muestras	185
15.	Valor pronóstico de los exosomas, así como de los niveles de miARNs validados evaluados de manera individual en los exosomas aislados en plasma y LBA en pacientes con CP	188
15.1.	Relación entre los niveles de exosomas y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico	189
15.2.	Relación entre los niveles de miARNs validados (miR-141 y miR-144) y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico	190
15.3.	Asociación entre los niveles de exosomas y la supervivencia de los pacientes	191
15.4.	Asociación entre los niveles de miRNAs validados y supervivencia de los pacientes	193

	DISCUSIÓN	197
16.	Consideraciones sobre los exosomas aislados del plasma y LBA de pacientes con CP y sin patología tumoral	204
17.	Consideraciones sobre los perfiles de expresión de miARNs contenidos en los exosomas	208
17.1.	Consideraciones sobre los miARNs con mayor expresión en las distintas poblaciones definidas	215
18.	Consideraciones sobre los perfiles de expresión de miARNs contenidos en los exosomas de la serie de validación	218
19.	Consideraciones sobre perfiles de expresión de citoquinas contenidos en los exosomas	220
20.	Consideraciones sobre la relación entre los niveles de exosomas y miARNs y parámetros clínico-patológicos de peor pronóstico, relación con supervivencia global	226
21.	PERSPECTIVAS FUTURAS	227
	CONCLUSIONES	231
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	235

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE PULMÓN

1.1. Generalidades

El término cáncer hace referencia a los diferentes tipos de neoformaciones malignas que se producen derivadas de los epitelios (carcinomas), de los tejidos conectivos (sarcomas), de los tejidos hematopoyéticos (linfomas/leucemias) y de las células de la glía del sistema nervioso central.

El cáncer de pulmón (CP) se produce por una malignización de las células que se originan en el epitelio de la vía aérea o parénquima pulmonar. Se trata de una enfermedad compleja, muy heterogénea y diversa en cuanto a su evolución natural. Engloba por tanto, un grupo distinto de tumores que comparten orígenes moleculares y celulares pero que pueden diferir en cuanto a su curso clínico y pronóstico.

A pesar de los avances realizados en el tratamiento del cáncer en los últimos años, el CP representa la primera causa de muerte por cáncer en países desarrollados [1, 2]. Constituye un importante problema de salud pública debido a su mal pronóstico pues la supervivencia bruta a los cinco años apenas alcanza el 15% [3]. Esto es debido a que más del 70% de los pacientes son diagnosticados en estadio avanzado donde el tratamiento no es curativo. De hecho, la supervivencia a 5 años tras el diagnóstico, ha cambiado muy poco desde 1974, de manera que la tasa de supervivencia ha aumentado tan sólo del 12.4% al 15% para pacientes diagnosticados entre 1996- 2000.

Es obvio que se necesitan nuevas aproximaciones para abordar el problema del CP siendo necesarias diferentes estrategias que mejoren los resultados de supervivencia. Estamos por tanto, ante un reto científico al ser necesario desarrollar abordajes epidemiológicos que posibiliten estrategias de prevención y nuevas técnicas de diagnóstico precoz así como optimizar el uso de todos los recursos con el fin de mejorar estos datos. Debemos abrir nuevas líneas de investigación

identificando pacientes de alto riesgo e identificando marcadores genéticos predictivos que nos puedan definir los distintos subgrupos de enfermos.

Por último, no debemos olvidar que los resultados de la investigación clínica y básica están permitiendo actualmente aumentar de forma muy modesta la mediana de supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada y mejorar su calidad de vida en los últimos años. Trasladar los conocimientos de los descubrimientos del laboratorio a la práctica clínica es algo cada vez más frecuente [4, 5] de tal forma que conseguiremos mejorar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes afectados por esta enfermedad [6].

1.2. Importancia demográfica del cáncer de pulmón

El CP es la neoplasia más frecuente diagnosticada en todo el mundo. De los 12.7 millones de casos de cáncer diagnosticados en el mundo en 2008, 1.6 millones de casos (13%) fueron de CP. De las 7.6 millones de muertes por esta enfermedad en ese año, 1.4 millones fueron como consecuencia de tumores de pulmón [7].

El CP por tanto, mantiene una alta letalidad. Se estima que de los 226.000 nuevos casos diagnosticados en EEUU en 2012, se produjeron más de 160.000 muertes, constituyendo la principal causa de muerte por cáncer entre hombres y mujeres [8]. De hecho, la supervivencia estimada va del 15% en Norteamérica a un 8,9% en los países en desarrollo.

En España las cifras son igualmente desalentadoras, en el año 2010 se produjeron 382.047 defunciones en todo el país, de ellas el 28.1% fueron ocasionadas por tumores, siendo la primera causa de muerte para la población de edad entre 5-14 años y 40-79 años. El CP fue el responsable de la mayor mortalidad con 20.723 muertes atribuidas a su causa, un 1,6% más que el año anterior [9]. Todo esto manifiesta que se trata de un problema de salud pública también en España y que nuestros esfuerzos deben centrarse en líneas de investigación que mejoren esos resultados. Este trabajo surge como un esfuerzo en la lucha por avanzar en el conocimiento de esta grave enfermedad.

Las diferencias geográficas y de género en la incidencia y mortalidad por CP son un reflejo de la exposición a su principal factor de riesgo, el hábito tabáquico [10, 11]. De hecho, el tabaquismo es el responsable de una auténtica epidemia de CP, de modo que los patrones de incidencia y mortalidad por CP han seguido, con una latencia de 20 años, al patrón temporal de consumo de tabaco [12].

El número estimado de casos de CP en el mundo se incrementó en un 51% desde 1985, un 44% en población masculina y 76% en mujeres. En el caso del hombre, el incremento es debido exclusivamente al envejecimiento de la población, ya que cuando la incidencia se ajusta por edad, se objetiva un retroceso leve del 3,3% en esos años [12, 13].

La eficacia de la lucha anti tabáquica en los distintos países se ha traducido en una disminución de la incidencia principalmente en el sexo masculino [14]. Por el contrario, en la población femenina parece haber un aumento del 22% y no ha sido hasta 2010 cuando se ha alcanzado una meseta, observándose ya una estabilización en su incidencia en países como EEUU, Reino Unido y Australia pero no así en España, Francia y Bélgica donde siguen apareciendo nuevos casos y se espera un aumento en los próximos años, debido a que el consumo de tabaco en mujeres apareció varias décadas más tarde que en hombres [15, 16].



			Hombre	Mujer			
Próstata	241.740	29%			226.870	29%	Mama
Pulmón	116.470	14%			190.690	14%	Pulmón
Colon y Recto	73.420	9%			70.040	9%	Colon y Recto
Vías urinarias	55.600	7%			47.130	6%	Endometrio
Melanoma	44.250	5%			43.210	5%	Tiroides
Riñón y pelvis	40.250	5%			32.000	4%	Melanoma
Linfoma No Hodgkin	38.160	4%			31.970	4%	Linfoma No Hodgkin
Cavidad oral y faringe	28.540	3%			24.520	3%	Riñón y pelvis
Leucemia	26.830	3%			22.280	3%	Ovario
Páncreas	22.090	3%			21.830	3%	Páncreas
Total	848.170	100%			790.740	100%	Total

Figura 1: Nuevos casos de los 10 cánceres más frecuentes estimados por sexo y tipos. EEUU, 2012. Los datos están estandarizados por edad a la población de EEUU en 2000 y expresados por 100.000 personas.

La mortalidad por cáncer de pulmón ha comenzado a descender sobre todo en la población masculina como consecuencia de la ya comentada disminución del consumo de tabaco. El descenso de mortalidad en mujeres ha alcanzado una meseta en algunas zonas, aunque actualmente casi la mitad de las muertes por cáncer de pulmón son en mujeres [17, 18, 19].



			Hombre	Mujer			
Pulmón	87.750	29%			72.590	26%	Pulmón
Próstata	28.170	9%			39.510	14%	Mama
Colon y Recto	26.470	9%			25.220	9%	Colon y Recto
Páncreas	18.850	6%			18.540	7%	Páncreas
Hígado y vías biliares	13.980	5%			15.500	6%	Ovario
Leucemia	13.500	4%			10.040	4%	Leucemia
Esófago	12.040	4%			8.620	3%	Linfoma no Hodgkin
Vías urinarias	10.510	3%			8.010	3%	Endometrio
Linfoma no Hodgkin	10.320	3%			6.570	2%	Hígado y vías biliares
Riñón y pelvis	8.650	3%			5.980	2%	Sistema nervioso central
Total	848.170	100%			275.370	100%	Total

Figura 2: Muertes estimadas por cáncer (se representan los 10 más frecuentes) según sexo y tipos. EEUU, 2012. Los datos están estandarizados por edad a la población de EEUU en 2000 y expresados por 100.000 personas.

El aumento progresivo de su incidencia en determinados grupos de población sobre todo en mujeres, junto a la mortalidad elevada que se asocia a este tipo de neoplasia, ha generado la necesidad de optimizar las herramientas de las que disponemos para su diagnóstico, su abordaje terapéutico y la predicción del pronóstico de esta enfermedad.

Actualmente existe un interés creciente por la investigación traslacional de esta patología con respecto a tres ámbitos referidos: el *diagnóstico*; reclasificando los tumores en base a la expresión diferencial de genes que identifiquen subtipos determinados, el *tratamiento*; identificando dianas moleculares potencialmente inhibibles de forma específica y en el *pronóstico*; elaborando perfiles génicos o proteómicos con capacidad para predecir la evolución de un subgrupo concreto de pacientes. Este trabajo pretende aportar información científica sobre los mecanismos que el CP desarrolla durante su progresión con los tejidos vecinos y con el huésped a nivel molecular.

1.3. Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón

Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica (*American Society of Clinical Oncology*), la probabilidad de padecer un cáncer de pulmón en los varones fumadores es del 0,03 hasta la edad de los 39 años; del 1.08 entre los 40 y 59 años; y del 5,75% de los 60 a los 79 años [20].

La incidencia del CP es muy elevada, y su supervivencia muy pobre, en parte atribuida a su diagnóstico tardío. Es por este motivo por lo urgen estrategias de diagnóstico precoz, teniendo presente que existe una población real de alto riesgo en la que un diagnóstico en las primeras fases permitiría la curación de un gran número de casos.

La aplicación de un programa de detección sistemática o cribado, pasa por la necesidad inminente de determinar la población de riesgo que más se beneficiaría de un diagnóstico precoz. La aplicación de la biología molecular a este campo

permite mejorar los resultados de las técnicas convencionales mediante la determinación de marcadores en esputo, en el lavado broncoalveolar (LBA) y en sangre. En este sentido nuestro trabajo, como se ha comentado, pretende trabajar con el material genético específico de células tumorales obtenido de otras fuentes no tumorales.

Desde hace más de 20 años, los resultados de ensayos clínicos aleatorizados no muestran que los cribajes efectuados con citologías de esputo y radiografías de tórax haya conseguido una reducción significativa de la mortalidad por cáncer de pulmón, aunque bien es verdad que estos estudios adolecen de errores metodológicos.

A pesar de ello, el interés por buscar otras formas de detección sistemática se ha intensificado en los últimos tiempos con técnicas de imagen como la Tomografía Axial Computerizada o TAC [21, 22]. Los resultados de esta técnica son prometedores, pero no ha sido hasta los últimos años cuando ha habido evidencia definitiva de que el cribaje con TAC permite disminuir la mortalidad asociada a esta neoplasia. Existe además un riesgo añadido de sobre diagnóstico consistente en la detección de nódulos pulmonares que permanecerían clínicamente indetectables de otra manera [23]. Por todo ello, para mejorar en la supervivencia del CP, sería preciso optimizar el diagnóstico precoz para controlar la enfermedad en sus fases más iniciales.

El estudio I-ELCAP fue un proyecto multicéntrico que se llevó a cabo en población asintomática con edad igual o superior a 40 años y riesgo de CP: fumador o exfumador o no fumador con antecedentes de exposición ocupacional (asbesto, berilio, uranio o radón) o al tabaco de forma pasiva (con o sin historia de CP). El objetivo era determinar si en pacientes diagnosticados en un programa de despistaje por TAC torácico o espiral de baja dosis anual, la intervención precoz era suficientemente efectiva para justificar dicho programa.

La mayoría de los CP diagnosticados eran estadios I (85%), la proporción de CP fue del 1,3% con TC basal y 0,3% con TAC anual, datos que son algo superiores a los obtenidos con la mamografía en cáncer de mama. La supervivencia a los 10 años conseguida por todos los pacientes con diagnóstico de CP fue del 80%, 88% si se intervenían quirúrgicamente (94% en estadio I) y 92% si la cirugía se practicó en el primer mes.

Se obtuvieron datos superiores a los observados cuando el diagnóstico se realiza fuera de un programa de despistaje, pudiéndose así reducir en un 80% en número de muertes por esta neoplasia. Se trata este, de un estudio caso control y no aleatorizado, que sería el idóneo para demostrar la utilidad real de esta técnica en la reducción de la mortalidad específica por CP, por lo que el estudio no supuso ninguna modificación respecto al cribado de esta neoplasia [24].

Posteriormente el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) americano puso en marcha un estudio aleatorizado (NSLT) para demostrar en una población de alto riesgo de padecer CP que la TAC de baja dosis conseguía disminuir la mortalidad por CP respecto a la radiografía de tórax.

La población que se sometió al cribado fueron personas de 55 a 74 años con una historia de tabaquismo de al menos 30 paquetes/año y, si eran exfumadores, debían haberlo dejado en los últimos 15 años. El estudio se realizó en instituciones americanas con elevada experiencia en radiología, en el diagnóstico y tratamiento del CP.

Destacó la elevada adherencia al protocolo por parte de los dos grupos, con un número pequeño de cribados realizados fuera del estudio. Destacó también la incidencia de falsos positivos que fue verdaderamente elevada, una importante limitación en esta técnica, aunque la mayoría de ellos no requirieron técnicas invasivas para su confirmación diagnóstica.

Se diagnosticó CP en un 3,96% de personas sometidas a cribado en el grupo de TAC de baja dosis y en un 3.52% en el grupo de radiografías de tórax. El dato más importante es que el número de muertes por CP con una mediana de seguimiento de 6.5 años fue de un 20% menor para el grupo de TAC de baja dosis ($p=0,004$) lo que significa que el número de personas cribadas con TAC para prevenir una muerte por CP es de 320. La conclusión de este estudio es clara, el cribado con uso de TAC de baja dosis reduce la mortalidad por CP [25].

Adquiere un enorme interés el coste/efectividad de la TAC de baja dosis por el elevado número de candidatos al cribado que debe ser analizado, considerando globalmente todos los costes. Los resultados son similares a los observados en el cribado de cáncer de mama y deben ser comparados con otras intervenciones en población de riesgo en deshabituación tabáquica.

Existen algunas técnicas moleculares de diagnóstico precoz que pueden complementar a los métodos clásicos de imagen que ya se están incorporando a los nuevos estudios de diagnóstico precoz. Esta estrategia complementaria, análisis molecular-técnica de imagen, iría dirigida a identificar aquellos fumadores con riesgo de desarrollar CP, siendo la finalidad de esta combinación de mejorar y complementar los resultados del cribado de imagen.

En la actualidad no existe discusión en cuanto a que el mejor método de prevención del CP siga siendo el control del tabaquismo, por ser el tabaco el responsable del 85% de los casos diagnosticado. En cualquier caso podemos afirmar que en la actualidad existe un test diagnóstico que ha resultado ser eficaz en el cribado del CP.

1.3.1. Nuevas modalidades de detección precoz: Biomarcadores en la detección precoz

Resulta muy interesante, como se comentaba previamente, la posibilidad de combinar técnicas radiológicas con el uso de marcadores moleculares que

confirmer la existencia de dichas células tumorales con el propósito de definir mejor las características del tumor o monitorizar la respuesta del mismo a los tratamientos.

La identificación de biomarcadores en la detección precoz del CP, hasta ahora ha tenido muy poco éxito. Se han realizado estudios con técnicas caras y poco asequibles sin resultados evidentes. Sería muy atractivo que los biomarcadores que puedan ser de utilidad en el entorno clínico se determinasen en muestras obtenidas de forma no invasiva.

En estos intentos de desarrollar esos nuevos biomarcadores para detección precoz en CP, la investigación pasa por diferentes fases y es necesario conocer las alteraciones moleculares implicadas en su patogénesis. Además es conveniente delimitar algunos candidatos entre los diferentes genes y proteínas que puedan estar alteradas para poder desarrollar herramientas más sencillas que permitan analizar estas alteraciones en muestras mínimamente invasivas. Por último, siempre debemos validar estas tecnologías en población de riesgo.

No se trata de un proceso sencillo y requiere esfuerzo por parte de los laboratorios de investigación básica. Nuestro trabajo pretende aportar datos sobre la detección de material genético extracelular de pacientes con CP, como base para los análisis de potenciales biomarcadores en esta patología.

Desde los estudios de citogenética, pasando por la biología convencional y molecular, así como técnicas de multianálisis de proteínas y arrays de expresión y el creciente interés por la proteómica, han intentado descubrir y avanzar en esta área dirigiendo los esfuerzos para identificar posibles genes y grupos de genes.

Chanin y col, han conseguido elaborar una lista de biomarcadores de detección precoz, aunque el grado de desarrollo de cada uno es muy variable y ninguno está validado [26].

Una vez consigamos encontrar un buen biomarcador será sólo el principio para la utilización rutinaria de marcadores moleculares de diagnóstico precoz. Al proceso de identificar un biomarcador sigue el de encontrar una técnica para poder detectarlo en muestras clínicas. Las muestras ideales son LBA, esputo, tejido. Nuestro trabajo persigue ese objetivo, al poder trabajar con fluido accesible de forma rutinaria en el curso del diagnóstico de estos pacientes.

1.3.1.1. Biomarcadores en sangre

Es una gran ventaja poder analizar biomarcadores en sangre, suero o plasma por la mínima invasividad que supone la obtención de las muestras y las diferentes técnicas existentes para el análisis rápido y masivo de las mismas.

En este campo de investigación, que comenzó ya hace décadas, existen distintos trabajos sobre detección en suero de mutaciones de KRAS o TP53, alteraciones en microsatélites, ADN circulante, pérdidas de heterocigosidad, etc, todo ello ya publicado previamente.

En este sentido, muestras biológicas de LBA, nos proporcionan datos que proceden de la composición molecular de fluidos procedentes de una vía aérea, lo que podría ser mucho más específico, pues informa única y exclusivamente de los cambios moleculares del epitelio del pulmón y vía aérea.

1.4. Breve recuerdo clínico

La posible existencia de un CP se sospecha clínicamente cuando el paciente presenta alguno de los síntomas habituales generalmente de tipo respiratorio. Sólo en menos de un 10% de casos el diagnóstico es un hallazgo casual [27]. Las manifestaciones clínicas del cáncer no microcítico de pulmón (CPNM) dependen de la localización del tumor primario, de la afectación locorregional y de las localizaciones de afectación metastásica que existan.

Los síntomas más frecuentes de los pacientes en el momento del diagnóstico del CP están expuestos en la siguiente tabla:

Síntomas y Signos	Frecuencia (%)
Tos	8 - 75
Pérdida de peso	0 - 68
Disnea (dificultad para respirar)	3 - 60
Dolor torácico	20 - 49
Hemoptisis (esputos con sangre)	6 - 35
Dolor óseo	6 - 25
Fiebre	0 - 20
Síndrome de la vena cava superior	0 - 4
Disfagia	0 - 2
Estridor laríngeo	0 - 2

Tabla 1: Síntomas y signos más frecuentes manifestados en pacientes con CP

1.4.1. Manifestaciones relacionadas con la localización del tumor primario

- Tos: es el síntoma inicial más frecuente en el CP y está presente en más del 70% de los pacientes en el momento del diagnóstico, aunque puede reaparecer e intensificarse en la fase avanzada de la enfermedad. Está ocasionada por el crecimiento endoluminal del tumor en la mucosa bronquial o por la compresión de la afectación ganglionar, aunque puede deberse a otras causas.
- Disnea: es una sensación subjetiva que consiste en la dificultad para desarrollar el trabajo respiratorio normal. Dado que el proceso de respiración es involuntario, la disnea es una experiencia desagradable para el enfermo. Su incidencia llega hasta el 60% a lo largo de todo el proceso y hasta en un 75% en las fases finales de la enfermedad. Suele deberse a una obstrucción bronquial y asociarse con un incremento de la tos y de la expectoración. Es más frecuente en los tumores centrales. Es un problema importante para el paciente que

conduce a una de las principales quejas en la consulta y origina un claro deterioro en la calidad de vida del paciente [28].

- Hemoptisis: es la expulsión por la cavidad oral de sangre que procede el árbol respiratorio. La hemoptisis aparece en un 7-10% de los pacientes al diagnóstico y llegará hasta el 25% a lo largo de la enfermedad [29]. La hemoptisis se debe a necrosis del carcinoma localizado en carina o bronquios principales, ulceración de la mucosa bronquial y erosión de los vasos principales, fundamentalmente.
- Dolor torácico: puede ser un síntoma inicial en un 20-50% de los casos y sus características dependen de la localización del tumor, la extensión e invasión de los tejidos. Es más frecuente en tumores periféricos, especialmente si afectan a la pleura o pared torácica.
- Fiebre: suele ser consecuencia de la neumonitis que se produce por la obstrucción tumoral bronquial, originando un cuadro febril que muchas veces requiere ingresos hospitalarios.

1.4.2. Manifestaciones relacionadas con la extensión locorregional intratorácica

- Síndrome de Vena Cava Superior: se produce por la obstrucción parcial o completa de la vena cava en su trayecto hacia la aurícula por compresión ganglionar o tumoral, invasión directa del tumor y ocasionalmente trombosis intraluminal. En el 90% se debe a tumores intratorácicos.
- Síndrome de Pancoast: se produce por la presencia de un carcinoma en la zona posterior del extremo apical del lóbulo superior muy cerca del plexo braquial, ocasionando la infiltración del octavo nervio cervical, primer y segundo nervio torácico y el ganglio estrellado. Todo esto causa dolor en cintura escapular irradiado a brazo, antebrazo por el lado cubital y atrofia de la musculatura escapular.

- Síndrome de Horner: se debe a la afectación del sistema simpático y del ganglio estrellado, produce sintomatología unilateral de enoftalmos, disminución de la sudoración unilateral en la cara y miembros superiores.
- Taponamiento cardíaco: el compromiso pericárdico por el CP es poco frecuente y se origina por extensión directa del tumor o diseminación retrógrada de los linfáticos mediastínicos y epicárdicos.

1.4.3. Manifestaciones de la enfermedad a distancia

La diseminación metastásica en CP puede producirse sobre todo, por vía hematógena, aunque también puede ser por vía linfática o más raramente interalveolar. Casi un 50% de los pacientes con CP van a tener enfermedad diseminada al diagnóstico y un tercio de ellos tendrá clínica asociada a la metástasis.

Las localizaciones metastásicas más frecuentes del CP son: glándulas adrenales, hueso, hígado, cerebro y pulmón.

La clínica derivada de la afectación metastásica dependerá del lugar de la enfermedad, la más frecuente se localiza en el esqueleto axial y la región proximal de los huesos largos, donde causa un dolor intenso, le sigue la afectación hepática, glándulas suprarrenales y metástasis cerebrales.

Los síndromes paraneoplásicos (SPN) constituyen un conjunto de trastornos clínicamente asociados a patología maligna, cuyo mecanismo es aún desconocido. Suelen manifestarse en el 10% de los pacientes, no guardan relación con el tamaño y en ocasiones preceden al diagnóstico del mismo. Son el resultado de la acción de sustancias biológicamente activas por parte del tumor. El CP es uno de los tumores que se asocian con mayor frecuencia a los SPN estimándose que entre un 10-20% de estos pacientes desarrollarán esta rara complicación [30].

1.5. Clasificación histológica

Entre las diversas clasificaciones nosológicas del CP, la clasificación más utilizada es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualizada en el año 2015, que se basa en criterios de microscopia óptica [31].

Más del 99% de los CP son de tipo epitelial, es decir, carcinomas y se distinguen de forma general cuatro grandes variantes; el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide, el carcinoma de célula grande y el carcinoma de célula pequeña o carcinoma microcítico de pulmón (CMP). Dado que este último tiene un comportamiento clínico diferente que implica un planteamiento terapéutico distinto al resto de tipos de CP, suele establecerse una distinción entre esta variante y las otras, que habitualmente se engloban dentro de CPNM.

Dentro del CPNM el adenocarcinoma es el subtipo histológico más frecuente en el mundo occidental (35-40%) y también en España donde está experimentando una elevación significativa, representando un 28% en varones y el 42% en la mujer. La razón principal de este aumento no está clara, siendo para algunos autores debido a la mejor caracterización mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) de tumores antes considerados indiferenciados y para otros debido a la introducción de filtros en los cigarrillos a partir de 1960.

No existen dudas acerca de los criterios morfológicos que definen los tumores de células pequeñas frente a los de célula no pequeña. Sin embargo, dentro de estos últimos, la diferenciación entre los distintos subtipos patológicos es bastante imprecisa y se contrasta la variabilidad importante entre distintos patólogos. En los últimos años se empiezan a emplear estudios basados en técnicas IHQ con marcadores concretos y se ha empleado la tecnología de microarrays para identificar perfiles que determinen este tipo de tumores. También se ha utilizado esta tecnología para la subclasificación de los adenocarcinomas reconociéndose un perfil concreto muy repetido en los tumores broncoalveolares. Por tanto, la

clasificación patológica del CP requerirá en este aspecto un perfeccionamiento futuro.

El análisis de patrones de expresión proteica permite clasificar los tumores en base a los perfiles de expresión proteica y de esta manera, se pudieron identificar subgrupos homogéneos de buen y mal pronóstico según el patrón en la espectrometría de masas.

En cualquier caso la estadificación molecular del cáncer de pulmón aún no es una realidad y ninguno de los múltiples datos disponibles sobre la importancia pronóstica de aspectos moleculares o biológicos de series aisladas tiene aún repercusión clínica asistencial, lo que solo debe servir como acicate para contribuir al rápido desarrollo de esta fascinante área de investigación.

1.5.1. Carcinoma de células pequeñas o carcinoma microcítico

Es uno de los subtipos más agresivos, por su rápido crecimiento y su tendencia a metastatizar desde fases tempranas. Sin embargo, también es uno de los tumores más sensibles a los tratamientos oncológicos. Desde el punto de vista histológico es un tumor neuroendocrino que se considera un subtipo distinto al de otros tumores neuroendocrinos aunque comparten la expresión de marcadores de diferenciación neuroendocrina.

La variante clásica aparece como un tumor formado por células pequeñas, redondeadas u ovaladas, con citoplasma escaso, bordes mal definidos, cromatina finamente granulada y alto índice mitótico.

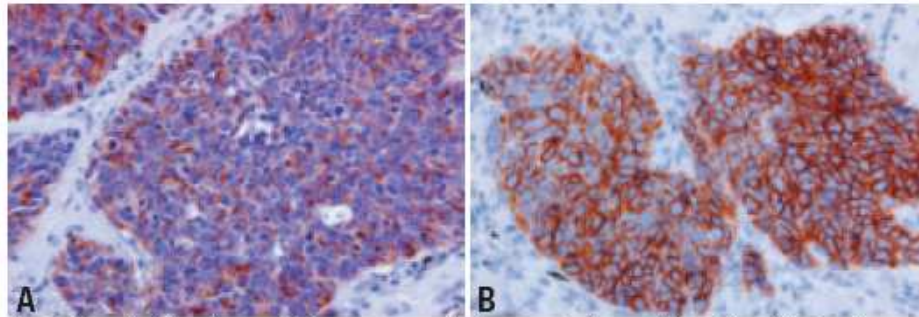


Figura 3: Imagen de carcinoma microcítico de pulmón. A. Célulaas tumorales mostrando el citoplasma teñido por la reacción con el anticuerpo para la cromogranina. B. Inmunoreactividad de las membranas celulares para CD56. (Tomada de Travis *et al*, 2014)

1.5.2. Carcinoma epidermoide

Es el más frecuente en los países occidentales. Suele ser central, pues nace frecuentemente en los bronquios proximales. Se caracteriza por su extensión in situ a lo largo de la mucosa bronquial. Tiende a ser localmente agresivo y afecta a las estructuras adyacentes por contigüidad. Se clasifica según el grado de diferenciación en:

- Bien diferenciado
- Moderadamente diferenciado
- Pobremente diferenciado

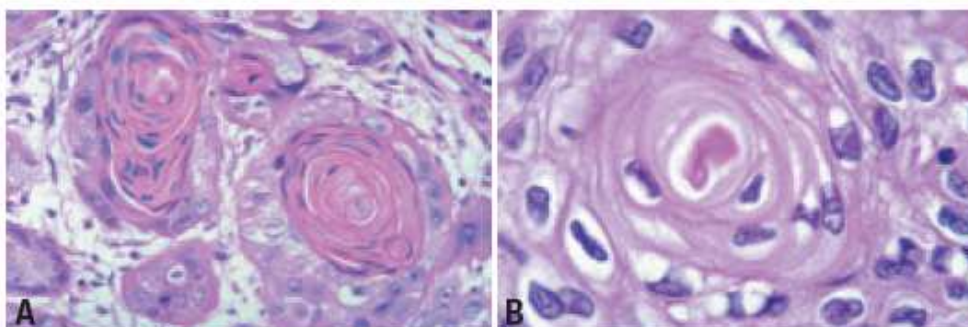


Figura 4: Imagen de carcinoma epidermoide de pulmón. A. Invasión del estroma fibroso por células escamosas bien diferenciadas por las perlas de queratina. La atipia citológica con nucleólos hipercromáticos indican malignidad. B. Diferenciación escamosa de las células malignas manifestada por la expresión de perlas de queratina. (Tomada de Travis *et al*, 2014)

1.5.3. Adenocarcinoma

Nace del epitelio de superficie o de glándulas mucosas bronquiales, está formado por células grandes con diferenciación glandular. Es el tipo histológico más frecuente en muchos países en los que su incidencia ha sobrepasado al carcinoma epidermoide. Suele aparecer como nódulo periférico bien definido que afecta pleura o pared torácica, también sobre cicatrices pulmonares o fibrosis.

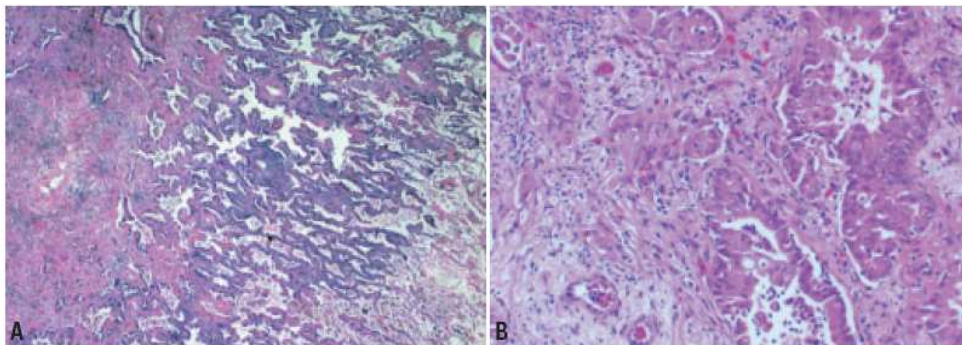


Figura 5: Imagen de Adenocarcinoma de pulmón. A, B: Se muestran áreas centrales de invasión en el adenocarcinoma de pulmón. La invasión está asociada con un aumento de la atipia citológica y estroma miofibroblástico (Tomada de Travis *et al*, 2014)

Existen varios subtipos en función de su patrón histológico:

- Adenocarcinoma acinar
- Adenocarcinoma papilar
- Adenocarcinoma mucosecretor
- Carcinoma broncoalveolar: Suele ser multicéntrico y bilateral. Nace de los neumocitos en los tabiques alveolares. Puede tener restos de diferenciación neuroendocrina. Clásicamente era considerado un tipo histológico diferente al adenocarcinoma por el hecho de que presente características histológicas propias, junto con un comportamiento biológico más favorable. Según la clasificación actual, el comportamiento benigno del adenocarcinoma broncoalveolar se debe sólo a que frecuentemente se diagnostica en estadios iniciales, no invasivos, por lo que debe considerarse un subtipo de adenocarcinoma.

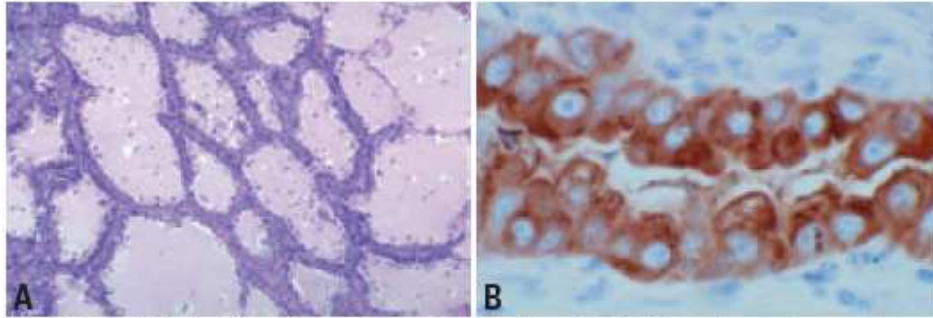


Figura 6: Imagen de Adenocarcinoma broncoalveolar. A. Se observan células tumorales creciendo de manera columnar hacia los septos alveolares. B. Inmunohistoquímica positiva para la apoproteína A. (Tomada de Travis *et al*, 2014)

1.5.4. Carcinoma de células grandes

Son tumores escasamente diferenciados. Suelen tener localización periférica, invadir la pleura visceral, la pared torácica o estructuras adyacentes. Se podría incluir como adenocarcinoma o carcinoma epidermoide escasamente diferenciados.

Hay varios subtipos:

- Carcinoma neuroendocrino de célula grande: tiene diferenciación neuroendocrina.
- Carcinoma de células claras.
- Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide.
- Carcinoma de tipo linfopitelioma.

1.5.5. Carcinoma adenoescamoso

Está compuesto por áreas de carcinoma epidermoide combinadas con áreas de adenocarcinoma que componen al menos cada una de ellas un 10%. La localización suele ser periférica y pueden presentar una cicatriz central.

1.5.6. Carcinoma sarcomatoide

Presentan un componente con diferenciación sarcomatosa o tipo sarcoma. Se trata de tumores grandes, generalmente menores de 5cm, bien delimitados con predilección por los lóbulos superiores. Se subdivide en:

- Carcinoma pleomórfico.
- Carcinoma de células fusiforme.
- Carcinoma de células gigantes.
- Carcinosarcoma.
- Blastoma pulmonar.

1.5.7. Tumor carcinoide:

Se caracterizan por tener patrones de crecimiento que sugieren una diferenciación neuroendocrina. Son tumores bien delimitados, típicamente asociados al bronquio y de crecimiento endobronquial. Se observan dos tipos histológicos: carcinoide típico y atípico.

1.5.8. Tumores de tipo glándula salival

1.5.9. Tumores mesenquimales

1.6. Clasificación molecular del Cáncer de Pulmón

A pesar de la creencia de que los carcinomas de pulmón son relativamente homogéneos desde el punto de vista histológico, esta creencia dista mucho de la realidad. En la última clasificación de CP publicada por la OMS, se llega a considerar que hasta el 50% de los tumores definidos en una u otra estirpe histológica pueden presentar componentes mixtos y de varios tipos histológicos, lo que dificulta mucho el correcto y exacto diagnóstico anatomopatológico y por extensión su estudio clínico y biológico.

Se ha demostrado solo un acuerdo del 40% entre diferentes patólogos expertos en patología pulmonar cuando se trataba de subclasificar el adenocarcinoma pulmonar. Por tanto la división histológica no es muy precisa pues se basa en muchas ocasiones en porcentajes, presencia de un determinado rasgo microscópico, etc., hechos que no reflejan las verdaderas características clínico biológicas del tumor.

Como ejemplos la última clasificación adolece de los siguientes puntos:

- Falta de consenso en los criterios de definición del adenocarcinoma broncoalveolar
- Llamativa heterogeneidad histológica en los carcinomas epidermoides, no siendo infrecuentes los carcinomas epidermoides típicos que presentan áreas de enorme atipia y pleomorfismo
- Utilización excesiva del diagnóstico genérico de “carcinoma de pulmón de células grandes” al ser este un diagnóstico de exclusión
- Por todas estas razones no sorprende demasiado que el carcinoma de pulmón sea, comparándolo con otras neoplasias y considerando su elevada frecuencia y mortalidad, relativamente desconocido desde el punto de vista patológico y biológico

En este sentido, los estudios de los perfiles de expresión génica ofrecen la oportunidad de comparar miles de genes con los datos clínicos y anatomopatológicos, lo que está permitiendo un mejor entendimiento de esta neoplasia.

El grupo de trabajo de Yang y col. junto con el Meyerson y col. [32, 6] revisaron recientemente los estudios de perfiles de expresión génica en CP. Los genes

identificados deben ser validados mediante matrices de tejido. Esta validación idealmente debiera ser realizada mediante IHQ siendo esta una técnica muy estandarizada y difundida, de esta forma se permitirá explorar de forma más rápida y reproducible las hipótesis generadas mediante el estudio de los perfiles de expresión génica.

El resumen de los hallazgos encontrados por los recientes trabajos publicados por Meyerson respecto al análisis de expresión génica en cáncer de pulmón se expone a continuación [6]. Resaltar que existen genes con más interés futuro que son aquellos que se solapan entre los distintos trabajos:

- Carcinoma de células pequeñas. Tanto Garber y col [33] como Bhattacharjee y col. [34] identifican dos factores de transcripción interesantes; Islet-1 transcription - factor y Forkhead box G1B.
- Carcinoma epidermoide. Entre los genes que más se solapan destacan S100 -calcium-binding protein A2, Galectin 7, Ataxia-telangiectasia group D associated -protein y Bullous pemphigoid antigen I.
- Adenocarcinoma. Es probablemente en esta categoría donde los perfiles de expresión génica sean más útiles, dada la gran heterogeneidad histológica. Dos grandes series han encontrado grupos homogéneos; curiosamente dos de ellos tienen muchos genes en común (Surfactant protein, BENE, Selenium-binding protein I y Cytochrome b5).

Hoy en día aún hay que llegar a un consenso en lo referente a la estandarización del uso molecular para clasificar el CP, hay que establecer controles de calidad tanto externos como internos en los laboratorios. Las sociedades médicas de especialistas deberían proporcionar un soporte para estos controles y emitir acreditaciones a las unidades clínicas para que se trabaje con uniformidad de criterios y con la máxima garantía.

Los informes anatomopatológicos y moleculares deben estandarizarse conteniendo una serie de datos uniformes y universales como el tipo de técnica utilizada, el nombre comercial del kit, el lote, el tipo de alteración molecular detectada, la sensibilidad de la técnica, el material de partida (congelado, parafina, tumor primario o metástasis). Por último la integración de los servicios en unidades con acreditación de calidad debería ser la norma.

1.7. Estadificación del Cáncer de Pulmón

La correcta estadificación del CP constituye la piedra angular sobre la que se puede establecer el esquema terapéutico más adecuado a cada paciente, realizar un pronóstico certero e identificar subgrupos de pacientes que podrán beneficiarse de diferentes tratamientos y técnicas quirúrgicas. El empleo de un método formal para estadificar permite dar unos criterios uniformes para facilitar la comunicación de datos y analizar los resultados de diversas aproximaciones terapéuticas.

La estadificación del CP por el sistema de extensión anatómica TNM (del inglés, Classification of Malignant Tumours), acordado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) establece una clasificación del tumor en distintas fases o estadios como se muestra en la siguiente tabla.

Estadio	Descripción TNM
I	T1/T2 N0 M0
II	T1/T2 N1 M0 T3 N0 M0
III A	T3 N1 M0 T1/T2/T3 N2 M0
III B	T4 N0/N1/N2 M0 T1/T2/T3/T4 N3 M0
IV	T1/T2/T3/T4 N0/N1/N2 M1

Tabla 2: Sistema internacional de estadificación TNM para el CP

2. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN PATOLOGÍA PULMONAR

El carcinoma broncogénico debe estar presente en el diagnóstico diferencial de personas que desarrollan cualquier tipo de clínica neumológica o sistémica de causa no aclarada. La necesidad de la sospecha debe conducir a la realización de una radiografía de tórax y ante cualquier anomalía proseguir el estudio hasta alcanzar el diagnóstico.

En el momento actual, el método más accesible, sensible y específico para el diagnóstico de esta neoplasia es la broncoscopia. Esta exploración, efectuada por neumólogos expertos, diagnostica más del 90% de todos los tumores broncogénicos. La tecnología asociada a esa endoscopia incluye la biopsia con visión directa de la lesión, el examen citológico del aspirado o cepillado bronquial, la biopsia obtenida con control radiológico o la punción biopsia transbronquial guiada por ultrasonografía o radioscopia.

2.1. Broncoscopia

Desde sus inicios hace más de un siglo, la broncoscopia ha incorporado diferentes procesos de transformación y especialización convirtiéndose en un elemento fundamental dentro de la medicina moderna. En la actualidad el procedimiento es esencial en el diagnóstico, abarcando sus indicaciones la mayor parte de las enfermedades respiratorias siendo la pieza clave de la terapéutica neumológica actual.

La broncoscopia nace oficialmente a finales del siglo XIX cuando en 1897 Killian realiza la primera broncoscopia terapéutica para extraer un cuerpo extraño de la tráquea, demostrando que su realización era posible y bien tolerada [35]. El traqueobroncoscopio de Killian tenía una longitud de 18-41 cm con un diámetro de 9 mm, realizándose las exploraciones en decúbito supino, precisando de una fuente de luz auxiliar con lámpara frontal. [36, 37]. La primera traqueosbroncoscopia que

se realizó en España la hizo A. García Tapiador en 1900 en un paciente portador de una traqueostomía [38].

Durante décadas el abordaje endoscópico de la vía aérea inferior se realiza mediante broncoscopia rígida (BR) y las indicaciones eran principalmente terapéuticas. Junto a Gustav Killian a quien hay que atribuir la idea de diseñar un broncoscopio rígido con los orificios distales para permitir la ventilación del pulmón sano cuando dicho instrumento estuviera canalizando el pulmón contralateral, hay que destacar que Chevalier Jackson, otorrinolaringólogo de Philadelphia, incorporó el canal de trabajo, la luz en el extremo distal del broncoscopio y un infatigable esfuerzo en la docencia de la técnica [39].

En los comienzos del siglo XX se da un gran impulso a la endoscopia respiratoria con la constitución en 1917 de la Sociedad Americana de Broncospia y dos años más tarde, en 1919 se constituye la primera cátedra de broncoscopio y esofagoscopia en la Universidad de Pensilvania, recayendo el nombramiento en Chevalier Jackson [40]. En nuestro país la BR fue instaurándose de forma progresiva, siendo en los años 1940-60 cuando es considerada ya una técnica de exploración habitual en los hospitales. En la actualidad la BR ha recuperado un lugar destacado en la clínica.

La auténtica revolución llegaría en la década de los sesenta. El cirujano torácico Ikeda acuerda en 1964 con la compañía *Machida Endoscopic C.* el desarrollo de un broncoscopio flexible (BF). El primer modelo es presentado por el propio Ikeda en 1966 durante el 9º Congreso Mundial de enfermedades del tórax, en Copenhague [41, 42]. Su constitución era de fibra de vidrio, con una gran flexibilidad distal y con un calibre de 5 mm. Permitía la visión directa contando con una pequeña luz auxiliar. Sin embargo, no permitía la toma de muestras o biopsias. Este acontecimiento supuso un gran avance en la patología respiratoria al hacer posible la exploración de amplios territorios anatómicos del árbol bronquial no accesibles con el BR. Unos años después es comercializado para uso clínico y se inicia el gran desarrollo de la técnica al ampliarse enormemente las posibilidades diagnósticas y

de aprendizaje, siendo un procedimiento más fácil y menos costoso que la BR. Se introdujo la posibilidad de realizar toma de muestras biológicas e histológicas, lo que supuso el avance definitivo en la exploración neumológica. En 1974, Reynols y Newball introdujeron la técnica del LBA en la práctica clínica, aunque diez años antes Finley ya había realizado su descripción y forma de realizarlo [43, 44].

2.1.1. Técnica de la broncoscopia

La técnica de broncoscopia respiratoria ha sufrido un desarrollo notable en los últimos años, consistente en la universalización de la técnica en hospitales secundarios y puesta en marcha de unidades más complejas en centros terciarios, mediante la implementación de técnicas intervencionistas avanzadas y el trabajo cada vez más frecuente en las áreas de quirófano. Ello, unido a un crecimiento sostenido en el número de procedimientos hace que sea una técnica accesible y presente en casi todos los centros

El BF es un tubo flexible de longitud variable constituido por haces de fibra óptica, recubiertas de un material con bajo índice de refracción para que las ondas luminosas no sean refractadas fuera de las fibras ópticas.

Consta de 3 partes; cuerpo, cordón de inserción y cordón de luz, éste último está constituido por haces de fibra óptica que transmiten la luz desde la fuente de luz externa hasta el extremo distal del fibroscopio. Actualmente en la mayoría de los servicios de neumología se dispone de videobroncoscopio que incorporan una pequeña cámara digital en el extremo distal del BF que transmite las señales a un procesador de imágenes externo y se visualiza en un monitor de televisión.

El videobroncoscopio ofrece unas imágenes de mejor calidad, posibilita la realización de las exploraciones de una manera más cómoda y facilita el aprendizaje.

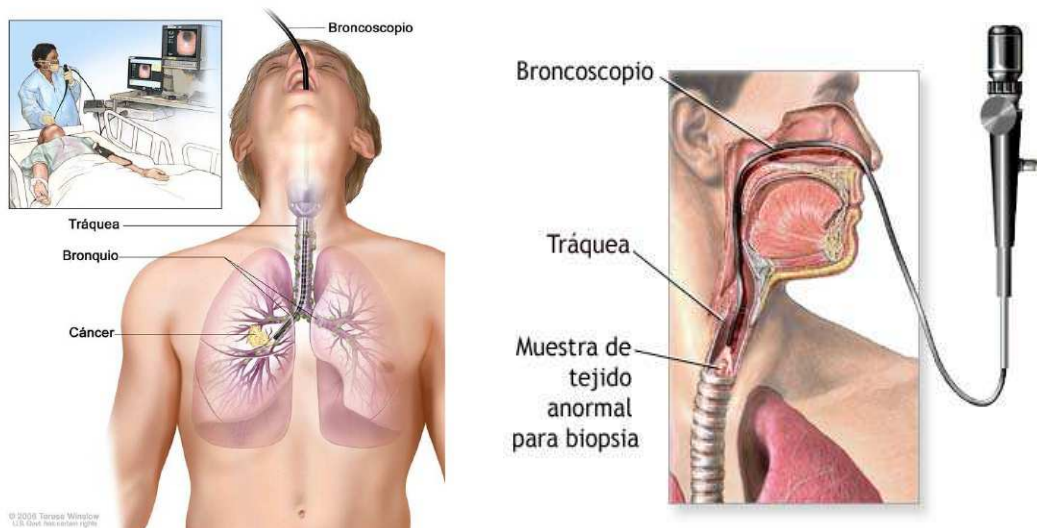


Figura 8: Representación gráfica del proceso de realización de una FBC. Tomada de A.D.A.M. Atlas de Anatomía Humana (Interactive Anatomy Online)

A la hora de realizar la técnica se debe explorar primero el árbol bronquial sano y dejar para el final el lado en el que se sospecha la lesión. De esta manera, se evita arrastrar hacia el lado sano material del lado patológico y se asegura una exploración completa que podría impedir la toma de muestras sobre la patología a estudio.

El examen broncoscópico debe estar sistematizado describiendo las características de la pared bronquial, la secreción y cualquier hallazgo anormal evaluando todos los territorios anatómicos por los que se progresa durante la exploración, estén o no incluidos en la patología sospechada o descubierta en el examen radiológico o de otro tipo, introduciéndose al menos hasta el nivel de bronquios segmentarios.

2.1.2. Técnicas de obtención de muestras endoscópicas

- Broncoaspirado (BAS): Se trata de una muestra recogida a lo largo de la broncoscopia mediante aspirado que contiene las secreciones bronquiales y el suero instilado. Es una técnica de fácil obtención que no alarga el tiempo de la exploración. Las indicaciones más frecuentes para su realización son la citología y el análisis microbiológico.

- Cepillado bronquial y transbronquial: La muestra se recoge con un pequeño cepillo legando la zona sospechosa. Su indicación es el diagnóstico citológico de neoplasia. Tiene la ventaja de tomar muestra de una extensión mayor que la biopsia pero la muestra no es histológica. Es conveniente realizarla después del broncoaspirado para evitar que se contamine por una hemorragia. En el caso del cepillado transbronquial el uso de control radioscópico reduce las complicaciones y aumenta la rentabilidad diagnóstica.

- Cepillado con catéter protegido: Fue descrito en 1979 [45] tiene como objetivo la obtención de muestras de la vía respiratoria inferior no contaminadas por la secreción de vías superiores. Se usa un doble catéter telescópico que lleva un cepillo en el interior del catéter interno y un material reabsorbible que ocluye el catéter externo y asegura que no se contamine el cepillo durante su progresión por el canal del BF. La técnica consiste en avanzar el BF hasta el bronquio segmentario seleccionado y, sin enclavar éste, se avanza el catéter telescópico hasta verlo en el extremo del BF. El catéter interno se empuja para liberar el tapón que ocluye el catéter externo y posteriormente se empuja el cepillo y se avanza unos centímetros fuera del catéter interno, tras tomar la muestra se reintroduce el cepillo en el catéter interno y se extrae todo el conjunto. La principal indicación es el diagnóstico de las neumonías bacterianas, especialmente en los pacientes sometidos a ventilación mecánica, inmunocomprometidos y neumonías recurrentes o que progresan a pesar del tratamiento antibiótico.

- Biopsia bronquial: Consiste en la obtención de muestras de 1-3 mm para estudio histológico mediante la utilización de diferentes tipos de pinzas de biopsia. Su principal indicación es el diagnóstico de procesos endobronquiales visibles, principalmente de las neoplasias centrales. Se llega a alcanzar una sensibilidad diagnóstica cercana al 90% dependiendo del tipo celular [46]. El mayor riesgo de la biopsia es la hemorragia, por lo que se recomienda instilar suero salino helado o adrenalina sobre la zona a biopsiar.

- Biopsia pulmonar transbronquial (BPT): La técnica fue descrita por Andersen de la Clínica Mayo en 1965 [47]. Inicialmente las muestras se obtenían usando el BR. Con la introducción del BF la técnica se fue popularizando y diez años después se publicaban amplias series de pacientes sometidos a BPT mediante BF con mínima morbilidad y mortalidad [48]. La indicación de la técnica son las lesiones periféricas localizadas, tumorales fundamentalmente y la enfermedad pulmonar difusa. El pequeño tamaño de las muestras obtenidas hace que sólo sea útil para el diagnóstico de neumopatías muy específicas (carcinomatosis, sarcoidosis, alveolitis alérgica extrínsea, histiocitosis X, amiloidosis, tuberculosis, proteinosis alveolar, neumoconiosis, eosinofilias pulmonares). El número de biopsias requerido depende de la enfermedad subyacente, experiencia del explorador y tamaño de las muestras fundamentalmente. En general, se recomiendan 5-6 biopsias para alcanzar una sensibilidad del 70-90% [49].
- Punción aspiración transbronquial o transtraqueal: con agujas de diferente calibre se punciona la lesión concreta y se aspira con una jeringa de 20 ml adaptada al extremo proximal del catéter portador de la aguja. Su indicación principal es el diagnóstico y estadiaje de CP. En el estudio de las adenopatías mediastínicas tiene un valor predictivo positivo (VPP) cercano al 100%.

2.2. Lavado broncoalveolar

La técnica de LBA descrita inicialmente por Reynolds y Newball en 1974 [50] fue concebida como procedimiento para analizar las células inmunes e inflamatorias de tracto respiratorio inferior tanto del pulmón normal como de diversos tipos de patología [51].

Es una técnica sencilla y bien tolerada, con escasa morbilidad y fácilmente repetible. Permite explorar una amplia extensión de tejido pulmonar, segmento o subsegmento. Puede practicarse en cualquier territorio pulmonar o incluso, en varios en el curso de la misma broncoscopia. Nos permite obtener una muestra

citológica representativa del espacio alveolo-intersticial. La buena correlación entre el tipo de células inmunes e inflamatorias obtenidas mediante el LBA y las observadas en muestras de biopsia pulmonar abierta, así como la relativa ausencia de complicaciones importantes han contribuido a la expansión en su utilización.

A finales de los 80, la indicación principal del LBA era el estudio de las neumopatías intersticiales difusas. Sucesivos trabajos fueron confirmando que el líquido del LBA es una buena traducción de la celularidad existente en el alveolo y en el intersticio. Este valor es solo orientativo, pero junto con la clínica y la moderna radiología se convierte en casi diagnóstico. En los últimos años se han estudiado marcadores de la inflamación. Los componentes del material del LBA también han sido objeto de continuos estudios [52].

2.2.1. Técnica de realización

La realización del LBA es sencilla y alarga unos pocos minutos la duración de la BF. Se realiza encajando el BF en un bronquio segmentario o subsegmentario del territorio a estudio y se instilan tres alícuotas de 50 ml de suero salino fisiológico a temperatura ambiente. Después de cada instilación se aspira con la misma jeringa suave y manualmente el máximo fluido posible, adaptando la fuerza de la aspiración a la colapsabilidad bronquial. Si no se exige un territorio de lavado es preferible realizarlo en lóbulo o segmento medio porque suele ser más fácil la recuperación del líquido y se altera menos la función pulmonar [53, 54].

El porcentaje de líquido recuperado ha de ser del 25-30% del instilado para una buena eficacia diagnóstica, representando los primeros 50 ml (fracción bronquial) la secreción bronquial, con mayor porcentaje de neutrófilos y de células de la mucosidad bronquial. Suele ser translúcido u opalescente dependiendo de la cantidad de material celular y no celular en suspensión. En los casos de hemorragia alveolar difusa, es típico el aspecto sonrosado o marrónáceo, más intenso en las últimas alícuotas recuperadas. Distintos factores tales como el hábito en la realización de la técnica, grado de tolerancia, deterioro funcional previo y tipo de

patología subyacente posiblemente determinen en mayor o menor grado el porcentaje de fluido recuperado.

Antes de retirar el broncoscopio, se hace toser al enfermo, con objeto de eliminar parte del líquido que haya quedado retenido; esta fracción de líquido instilado no se incluye en el procesamiento del LBA. Algunos autores recomiendan realizar el LBA en dos segmentos diferentes para obtener una muestra más representativa del parénquima pulmonar, necesidad que no ha sido confirmada en otros estudios. El LBA practicado en un bronquio subsegmentario con 150 ml puede explorar un millón de alveolos [55, 56].

2.2.2. Técnicas de LBA protegido

En los últimos años se han descrito algunos métodos de LBA en los que la instilación y la aspiración subsiguiente se realizan a través de un catéter especial provisto de un tapón distal reabsorbible. La finalidad de estos métodos es obtener fluido alveolar con menor riesgo de contaminación por las secreciones de las vías aéreas superiores.

Procesamiento y estudio de muestras:

En el fluido recuperado se pueden analizar sus diversos componentes: células, sustancias químicas en solución, microorganismos y partículas minerales. El líquido debe procesarse dentro de las primeras 4 horas, si ello no es posible, por traslado a otro centro u otro motivo, parece aconsejable mantenerlo a 4°C, así como resuspender la muestra obtenida en tubos de 50 ml con solución buffer salina, sin iones calcio ni magnesio.

Parece evidente que la fracción de líquido aspirado después de la primera instilación de suero salino puede ser en gran parte secreción bronquio. Por ello es aconsejable descartar esta primera fracción para el estudio de bacterias o de la

fórmula celular, pero esta primera fracción si debe aprovecharse para el diagnóstico de las neoplasias.

La eficacia diagnóstica del LBA es muy variable según la patología de que se trate. Tiene valor diagnóstico en algunos casos y en otros puede orientar al diagnóstico o ayudar al manejo de una enfermedad. Es especialmente útil en el estudio de las infecciones pulmonares en el paciente inmunocomprometido [57, 58, 59].

Análisis celular

El recuento total de células se realiza en una cámara Neubauer. Con el colorante Azul de Tripán se valora de forma sencilla la viabilidad celular, esta determinación es necesaria si se quieren realizar estudios funcionales de las células del LBA. Además si la viabilidad es inferior al 85% debe sospecharse un posible defecto en la técnica o en el transporte del LBA y por tanto, interpretar los resultados con cautela [60].

El recuento porcentual de la población celular es uno de los objetivos principales del LBA en las neumopatías intersticiales. Para determinar la fórmula celular, en primer lugar se separan las células mediante centrifugación. El sobrenadante se utiliza para el estudio de las sustancias químicas en solución. El concentrado celular se resuspende en una solución que no contenga iones de calcio o magnesio. La suspensión se ajusta a 1-1.15 millones de células por ml y de 70.000 a 100.000 células de esta resuspensión se utilizan para obtener muestras celulares con citocentrifugación a 500 g durante 5-10 minutos. Después de la tinción con Giemsa o Papanicolau se hace el recuento porcentual de tipos celulares en un mínimo de 300 células. Además se pueden realizar otras tinciones para estudios especiales.

Las subpoblaciones linfocitarias se estudian con anticuerpos monoclonales, mediante métodos inmunoenzimáticos o con citometría de flujo. Ésta permite detectar por inmunofluorescencia moléculas de la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales. El citómetro de flujo consiste en a) fuente láser b)

sistema de flujo laminar en el que las células interaccionan con el láser c) serie de detectores y filtros que permiten captar parámetros variados d) amplificación y reconversión analógico-digital de las señales y e) ordenador y programas de análisis.

Este método aporta una información semicuantitativa precisa y en tiempo real de la población celular estudiada (reconocimiento y recuento a una velocidad de hasta 5.000 células/segundo) con posibilidad de doble marcaje.

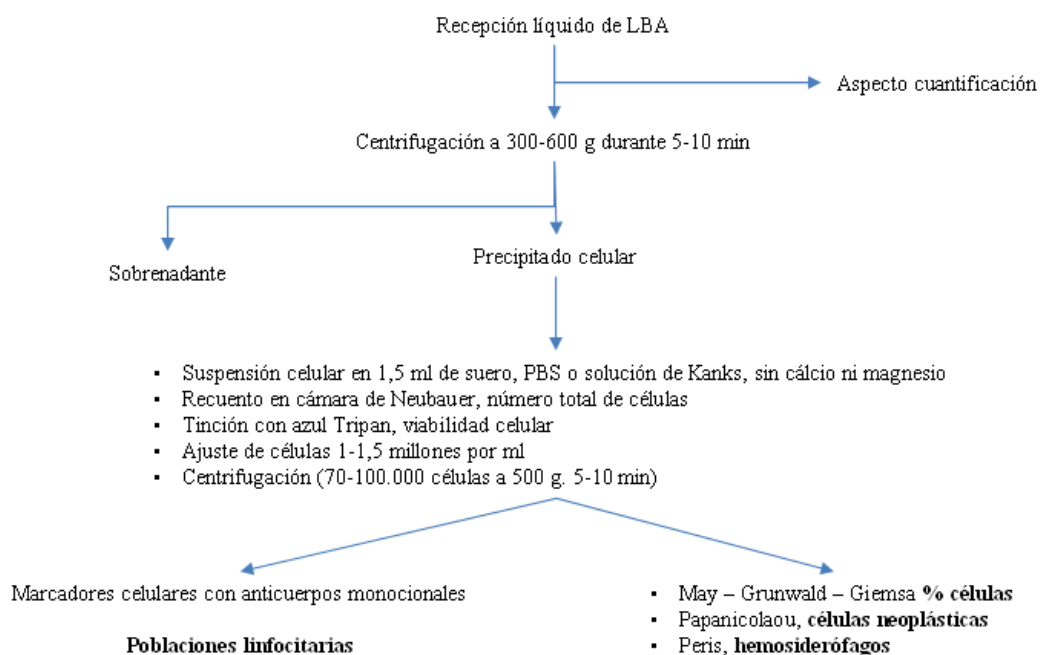


Figura 9: Esquema del análisis celular del LBA.

Estudio de las sustancias químicas en solución

Con diversas metodologías, se han estudiado proteínas, lípidos, el sistema de complemento, enzimas, marcadores tumorales, etc, pero los resultados hasta la fecha se han demostrado poco útiles para la práctica clínica habitual. Hasta la fecha los resultados son tan variables que resultan poco susceptibles para la práctica clínica habitual [61, 62].

Identificación de microorganismos

EL LBA se ha empleado en el diagnóstico de todas las infecciones broncopulmonares. Es controvertido el riesgo de contaminación del LBA por las secreciones de la vía aérea superior. Al permitir la obtención de un volumen importante de fluido alveolar es muy eficaz en el diagnóstico de infecciones por microorganismos oportunistas.

Para el diagnóstico de infecciones bacterianas, del líquido del LBA se realiza una tinción Gram y un cultivo cuantitativo. En general se valoran como significativos los aislamientos de 10.000 unidades formadoras de colonias por ml. La existencia de más de un 1% de células escamosas epiteliales puede ser indicativo de la excesiva contaminación de la muestra por secreciones orofaríngeas. Por otra parte, el hallazgo de bacterias intracelulares es muy indicativo de infección pulmonar, el porcentaje significativo de células con bacterias intracelulares oscila entre el 2 y el 10% según distintas experiencias.

El diagnóstico de infecciones por virus se basa en la detección citológica de cuerpos de inclusión, métodos serológicos y cultivo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los anticuerpos monoclonales pueden ser útiles en un futuro próximo. Para la identificación de hongos es útil la tinción con metenamina argéntica y el cultivo Sabouraud.

Detección de partículas minerales

Los cuerpos ferruginosos se visualizan mediante microscopia óptica con las tinciones habituales de Giemsa y Papanicolau. Sin embargo, para su cuantificación es preciso filtrados con filtros millipore de 5-2 µm del fluido de LBA sin filtrado previo. Cuando los datos clínicos y radiológicos no son claros, pueden ser útiles las técnicas micro analíticas para la cuantificación de las partículas minerales. La identificación de partículas minerales en el líquido del LBA es diagnóstico de exposición pero no de enfermedad.

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos y del tejido conjuntivo.

Estos mediadores solubles que comunican unas células con otras, controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos. Cada citoquina se une a receptores de superficie celular específicos generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citoquinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación. La deficiencia de los distintos tipos, bien de las citoquinas o de sus receptores produce distintas patologías y paulatinamente están emergiendo evidencias claras que relacionan diferentes desórdenes en las cadenas de citoquinas y la evolución de tumores malignos.

Las citoquinas desempeñan un papel esencial en la inflamación y regulación de la respuesta inmune. Su estudio en LBA constituye uno de los campos abiertos de investigación más prometedores. Puede permitir profundizar en la patogenia de diversas neumopatías, así como en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más selectivas y eficaces. En la práctica pueden emplearse diferentes técnicas para detectar en las muestras de LBA la presencia de ARNs específicos para cada citoquina, como Northern blot, hibridación in situ y transcriptasa inversa de PCR (RT_PCR) [63].

Citocinas inflamatorias	Citocinas hemopoyéticas	Citocinas que modulan y regulan la activación y efectos linfocitarios	Factores de crecimiento
Interleucina 1 (IL-1) Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) Interleucina 6 (IL-6) Interleucina 8 (IL-8) y otras intercrinas Interleucina 12 (IL-12)	Interleucina 3 (IL-3) Interleucina 7 (IL-7) Interleucina 9 (IL-9) Interleucina 11 (IL-11) Factores estimuladores de colonias (CSF) Factor estimulador de colonias macrofágicas (GM-CSF) Factor estimulador de colonias macrofágicas (M-CSF) Factor estimulador de colonias granulocíticas (C-CSF) Eritropoyetina (EPO) Factor de crecimiento hemolinfopoyético-1 (stem cell factor) (SCM)	Citocinas producidas por linfocitos T colaboradores tipo 1 (TH-1) Interleucina 2 (IL-2) Interferón gamma (IFN- γ) Linfotóxina o factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) Interleucina 13 (IL-13) Citocinas producidas por linfocitos T colaboradores tipo 2 (TH-2) Interleucina 4 (IL-4) Interleucina 5 (IL-5) Interleucina 10 (IL-10) Interleucina 13 (IL-13)	Factor de crecimiento epitelial (EGF) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Factor transformador del crecimiento (TGF) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) Factor de crecimiento endotelial (ECGF) Factor de crecimiento insulin-like (IGF)

Tabla 3: Clasificación de las distintas citoquinas según el efecto biológico predominante de cada mediador

3. PATOLOGIAS PULMONARES PREVALENTES

3.1. Neumopatías intersticiales difusas no infecciosas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan predominantemente al intersticio pulmonar, entendiendo este como el espacio anatómico comprendido entre las membranas basales del epitelio alveolar y el endotelio capilar.

Las EPID presentan unas características clínicas, radiológicas y funcionales respiratorias comunes. Se piensa en ellas como un síndrome clínico caracterizado por: disnea de esfuerzo, infiltrados intersticiales bilaterales en radiografía de tórax, anormalidades fisiológicas pulmonares consistentes en un patrón ventilatorio restrictivo y una disminución de la capacidad de difusión del dióxido de carbono junto con hallazgos histológicos que incluyan diferentes grados de inflamación y fibrosis en el parénquima pulmonar.

Previamente a su búsqueda, hay que descartar otras entidades que puedan cursar con manifestaciones clínicas y radiológicas similares como la insuficiencia cardíaca, las bronquiectasias, la linfangitis carcinomatosa, la tuberculosis miliar, las neumonías y los infiltrados pulmonares en pacientes inmunodeprimidos [64].

El LBA y la BPT son los dos procedimientos habituales de abordaje diagnóstico de los procesos intersticiales difusos. En ellas el LBA pretende valorar aunque sea indirectamente, el tipo de células existentes en el espacio alveolointersticial. En ocasiones este estudio puede tener valor diagnóstico, pero más a menudo ofrece sólo una orientación diagnóstica. Diversos estudios han confirmado que la celularidad hallada en el LBA es una traducción de la existente en el tejido pulmonar. Parece claro que la acumulación anormal de células en el espacio alveolointersticial o alveolitis modula la evolución y tipo de enfermedad.

3.2. Patología pleural y mediastínica

Si tras el estudio de un derrame pleural la causa del mismo permanece desconocida está indicada la realización de una BF para descartar proceso endobronquial que lo justifique, sobre todo en enfermedad tumoral obstructiva endobronquial. Cuando el derrame tiene cierta cuantía se observa un colapso de los bronquios inferiores con engrosamiento suave de la mucosa y superficie regular.

Igualmente, ante patología del mediastino es igualmente de gran ayuda diagnóstica evidenciando si existe o no invasión de la vía aérea y proporcionando en su caso el diagnóstico citológico mediante punción.

3.3. Hemorragia alveolar

La BF cumple un doble papel; de diagnóstico y terapéutico. Desde el punto de vista diagnóstico va a localizar el lugar de la hemorragia en el 90% de los casos [65].

Si se realiza precozmente, además, nos va a permitir conocer el diagnóstico histológico en un alto porcentaje de los casos según el proceso subyacente y el momento en el que hagamos la BF.

En estos casos, el aspecto macroscópico del líquido del LBA ya puede ser indicativo, por su color rojizo que aumenta en las alícuotas sucesivas. Los hemosiderófagos se identifican en tinción de Perls; aunque es discutido, se acepta que, como mínimo, para que sea significativo, debe haber más de un 15% de hemosiderófagos. Se ha descrito un índice de hemosiderina, basado en la intensidad de tinción de la célula con Azul de Prusia, que sería útil además para valorar la intensidad de la hemorragia: un valor superior a 50 sería diagnóstico de hemorragia. Superior a 100 de hemorragia grave.

3.4. Fibrosis pulmonar idiopática

La Fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se define como una neumopatía intersticial fibrosante crónica, limitada al pulmón, de causa desconocida, que afecta generalmente a adultos mayores de 50 años y asociada a patrón radiológico y/o histológico de la neuropatía intersticial usual [66]. Se desconoce si la incidencia y la prevalencia están influenciadas por factores étnicos, raciales o geográficos. En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia probablemente debido a la optimización de los métodos diagnósticos y al aumento de la esperanza de vida [67, 68].

La historia natural es variable e impredecible en el momento del diagnóstico, no obstante la mayoría presentan una lenta progresión con deterioro clínico y funcional que ocasiona insuficiencia respiratoria crónica.

Para llegar al diagnóstico definitivo se requieren unos criterios clínicos y una valoración multidisciplinar en la que participen neumólogos, radiólogos y patólogos expertos en el diagnóstico y manejo de las EPID consigue aumentar la precisión diagnóstica [69].

El LBA ha sido ampliamente utilizado para su estudio. Su análisis suele demostrar neutrofilia discreta con o sin eosinofilia y su empleo ha estado relacionado con su capacidad para descartar otras entidades. En el último consenso internacional, se señala que el LBA con análisis celular no debería realizarse de forma sistemática a todos los pacientes, si bien es de gran ayuda para descartar otras entidades.

Aunque todavía no suficientemente validados para incorporarlos en el seguimiento de los pacientes, se han descrito niveles elevados en suero de diferentes proteínas asociadas con la patogenia del FPI.

3.5. Bronquiectasias

Las bronquiectasias son dilataciones anormales e irreversibles de los bronquios con alteración del epitelio ciliar. No son una enfermedad en sí mismo, sino el resultado final de enfermedades diferentes que tienen puntos de manejo comunes. Suelen cursar con infección e inflamación bronquiales crónicas que se asocian con progresión. Las bronquiectasias afectan a una población heterogénea de pacientes y tienen etiologías muy diferentes, incluidas las de causa no conocida, cada una con sus propias características.

3.6. Sarcoidosis

En esta enfermedad suele encontrarse una alveolitis linfocitaria, con incremento del número y porcentaje de linfocitos (linfocitos T) y un cociente CD4/CD8 aumentado. Estos cambios en el LBA no son diagnósticos, pero se acepta que una linfocitosis con un cociente CD4/CD8 superior a 3.5 es muy indicativo de sarcoidosis. Si la enfermedad progresa hacia fibrosis puede haber un aumento del porcentaje de neutrófilos y un descenso del mencionado cociente. Se ha indicado que un aumento de los mastocitos sería un signo de mal pronóstico, con mala evolución y tendencia a la fibrosis. Se han descrito además cambios en los componentes solubles del LBA, concretamente aumento de la enzima convertidora de angiotensina, de la fibronectina, del factor derivado del plasminógeno, del ácido hialurónico, IL1y 2, del péptido del procolágeno tipo III y del INF gamma. Por el momento el LBA no es suficiente para formular el diagnóstico con certeza de la enfermedad, pero, ante un contexto compatible, el conjunto de cambios en el LBA sugieren el diagnóstico.

3.7. Infecciones pulmonares

En los últimos años, el LBA se ha usado ampliamente en el diagnóstico de las infecciones pulmonares, su sensibilidad y su especificidad varían según el enfermo y las características del agente causal patógeno.

En la tuberculosis pulmonar el *Mycobacterium tuberculosis* acostumbra a pasar a la secreción bronquial y es un patógeno obligado por lo que su identificación endoscópica no suele plantear muchas dificultades. Es discutible si el LBA reglado ofrece mayor sensibilidad que el simple broncoaspirado.

En la neumonía bacteriana el problema es más complejo al ser trascendente la contaminación o no de la muestra por la secreción de vías altas. Los múltiples trabajos en ese tema obtienen resultados contradictorios. Todos los estudios son difíciles de valorar al no existir un estándar plenamente satisfactorio.

En los enfermos inmunodeprimidos se producen infecciones a veces múltiples por cualquier microorganismo que tiende a acantonarse en los alveolos. Por ello, es aconsejable utilizar una técnica que permita identificar los patógenos no obligados y los patógenos que tiendan a permanecer en los espacios aéreos distales. El LBA es una técnica habitual para estudio de patógenos oportunistas y con cepillado protegido para estudio de bacterias. Del líquido recuperado deben hacerse las técnicas microbiológicas y citológicas necesarias para la identificación de micobacterias, hongos, virus y parásitos.

El rendimiento del LBA en estos enfermos es muy alto, se puede plantear el problema de si debe realizarse además una BTB, los diferentes trabajos en esta materia ofrecen resultados dispares, aunque parece evidente que si el LBA se practica en el territorio de máxima afectación radiológica, su rendimiento es máximo. Los aislamientos en el LBA de citomegalovirus y hongos son de interpretación delicada y deben valorarse conjuntamente con los demás datos clínicos.

4. BIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO Y DISEMINACIÓN TUMORAL

En los últimos años estamos asistiendo a un progresivo incremento en la comprensión de la biología molecular de la célula tumoral. Este conocimiento ha guiado el desarrollo de nuevas técnicas de investigación que nos permiten realizar un diagnóstico más preciso así como predecir con más exactitud la evolución del tumor.

Para poder comprender el fundamento de éstas es conveniente revisar una serie de aspectos básicos que intervienen en la patogénesis que nos permitirán comprender los mecanismos de dichas células.

La historia natural de los tumores malignos puede dividirse con fines académicos en cuatro fases: transformación, crecimiento, invasión local y metástasis a distancia [70, 71, 72]. La transformación engloba los mecanismos genéticos por los que una célula benigna pasa a ser maligna.

Desde un punto de vista biológico las células tumorales presentan fundamentalmente un crecimiento incontrolado, tienen capacidad para invadir y la pérdida de su diferenciación. Dos son los hechos más característicos con implicaciones clínicas, su crecimiento incontrolado y su capacidad de metastatizar.

4.1. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo y perfectamente regulado que puede dar lugar a la división celular o contribuir a la muerte celular programada o apoptosis. El desequilibrio en esta regulación del ciclo celular es la alteración clave de los tumores humanos y ocasiona la falta de diferenciación y el crecimiento aberrante.

En la célula eucariota normal los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia están estrictamente regulados, sin embargo estos procesos se alteran

profundamente en las células tumorales que pueden adquirir las propiedades de invasividad y potencial metastásico. La conversión de un fenotipo normal o un fenotipo tumoral se denomina transformación celular.

El mecanismo de carcinogénesis implica como se apuntó previamente un desorden del ciclo celular. El ciclo celular consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M.

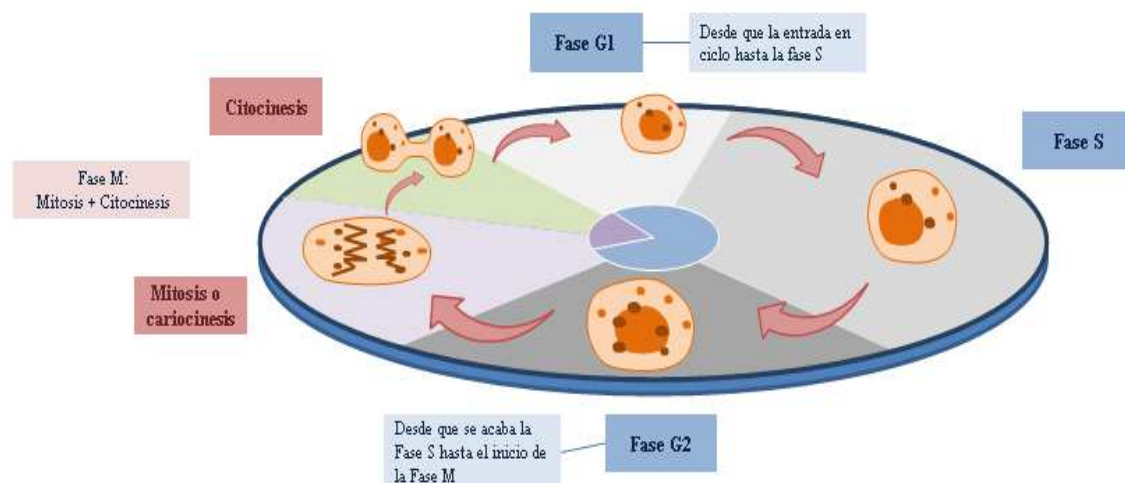


Figura 10: Imagen descriptiva del proceso complejo del ciclo celular

- **Fase G1:** Constituye generalmente la fase más larga del ciclo celular y se caracteriza por la síntesis del ARN y proteínas, representa para la célula un período decisivo para permanecer en quiescencia o comenzar a proliferar. La decisión de entrar en un nuevo ciclo o permanecer en fase G0 depende de los estímulos derivados del microambiente celular. Para que una célula pase a través de este punto y pase a fase S es preciso un cambio celular.
- **Fase S:** Cuando la célula entra en esta fase su división es irreversible. Es el período durante el cual se verifica la síntesis de ADN o la duplicación del material genómico. La síntesis de ADN no es constante a lo largo de esta fase, sino que representa un máximo pico en el período medio.

- Fase G2: Constituye el intervalo postsintético o premitótico durante el cual la célula sintetiza ARN y proteínas necesarias para la mitosis.
- Mitosis: Es la única fase morfológicamente identificable durante la cual se realiza el proceso de condensación, orientación, segregación y recondensación de los cromosomas que en condiciones normales garantizan una igual repartición del material genético en cada célula hija. Está dividida en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase.

La célula crece durante toda la interfase y fundamentalmente en G1 y G2, la síntesis de proteínas y de ARNs ocurre a lo largo de todo el ciclo, excepto en mitosis.

Todo está regulado mediante la activación secuencial de los distintos complejos quinasas dependientes de ciclinas (CDK, del inglés *cyclin-dependent kinases*). Existen dos puntos importantes del ciclo desde el punto de vista de la vulnerabilidad frente al cáncer que son la transición de G1 a S (controlado por Rb y p16 como genes supresores de tumores y por ciclina D1 y CDK4 como oncogenes) y el proceso de mitosis.

En el estricto control de la división celular juegan un papel importante las quinasas dependientes de ciclina. Existen nueve tipos distintos de CDKs (CDK1 a 9) y 15 ciclinas diferentes. Las CDKs son activadas por la unión de ciclinas específicas y esta activación regula el paso de una fase a otra del ciclo celular. Los complejos ciclina/CDK están negativamente regulados por moléculas endógenas, llamadas CKIs (del inglés, *cyclin-dependent kinase inhibitor protein*) o inhibidores de complejo ciclina-CDK. Existen dos familias de proteínas CKI.

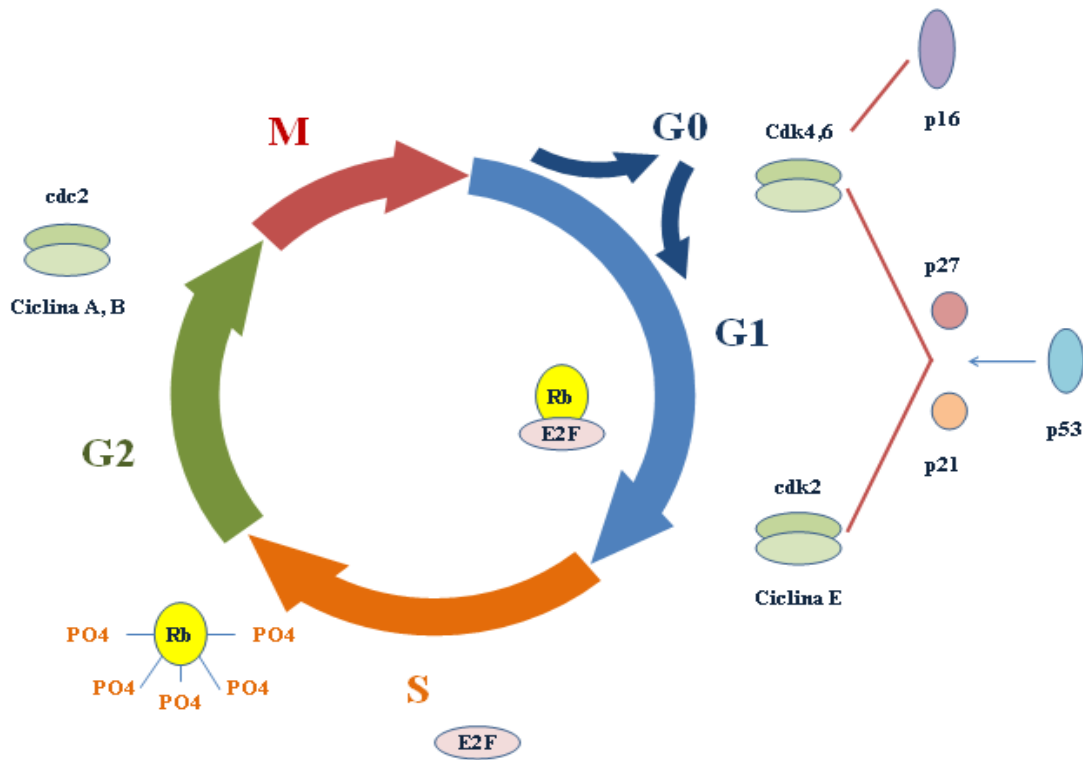


Figura 11: Imagen del estricto control del proceso de división celular

- Familia CIP/KIP: p21, p27 y p57. Son inhibidores generales de todos los complejos ciclina CDK y se acumulan en respuesta a un amplio rango de estímulos antiproliferativos.
- Familia INK4: p16, p15, p14, p18 y p19. Estas proteínas se unen de forma específica e inactivan las quinasas CDK4 y CDK6 induciendo la detención en fase G1 del ciclo celular.

Desde el estado de reposo G0 las células entran en fase G1 en respuesta a determinados estímulos mitogénicos. La progresión a través de la fase G1 precisa de la activación de CDK4 y CDK6 por unión de la ciclina D. La unión a CDK2 de las ciclinas A y E con las subsiguiente activación permite la progresión a través de la fase S. El complejo ciclina A/CDK1 modula la transición desde fase S a fase G2. La progresión desde la fase G2 a fase M requiere la formación de complejos ciclina B/CDK1.

La proteína Rb es el producto del gen del retinoblastoma, que es un gen supresor tumoral. La proteína Rb tiene un papel fundamental en el control de punto de restricción al final de la fase G1. Cuando la proteína Rb está hipofosforilada se une e inhibe al factor de transcripción E2F necesario para la progresión de la fase S, con lo que se bloquea la progresión de las células en fase G1. La fosforilación por los complejos ciclina D- CDK4/6 y ciclina E-CDK2 ocasiona su hiperfosforilación, con lo cual el factor E2F es liberado y permite el paso a la fase S, activándose los procesos de transcripción de genes implicados en la proliferación celular.

Una vez que la célula ha sobrepasado este punto de restricción, la progresión del ciclo celular es independiente de los factores de crecimiento. La función supresora de la proteína Rb puede alterarse no sólo por mutaciones del gen Rb, sino también por sobreexpresión de ciclinas y CDKs o bien por ausencia de expresión de p16 y p21 [73].

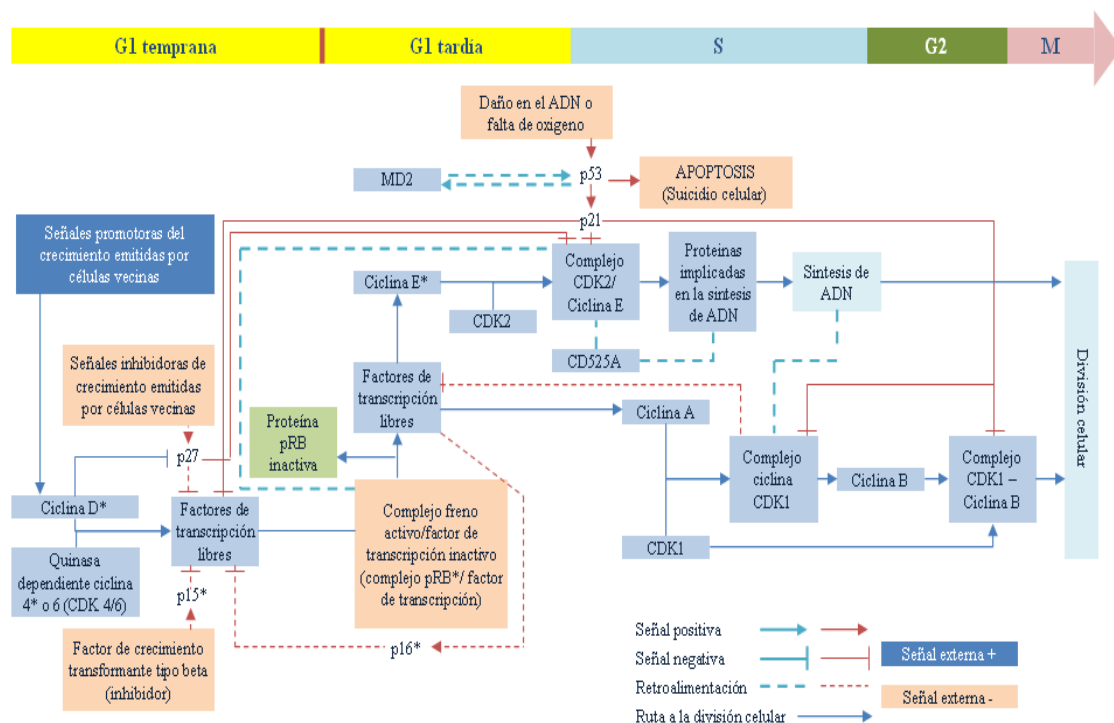


Figura 12: Imagen esquemática del complejo proceso de división intercelular

4.2. Carcinogénesis del cáncer de pulmón

El tabaco es la causa principal del CP, siendo responsable de más del 90% de los casos no sólo directamente sino indirectamente (tabaquismo pasivo) y en asociación con otras sustancias. Existen otras causas (polución ambiental, laboral o en los hogares) y factores modificadores del riesgo individual como la dieta o la susceptibilidad genética.

El humo del tabaco contiene alrededor de 4800 compuestos diferentes que pueden separarse en compuestos gaseosos y partículas. Al menos 60 de estos compuestos son considerados carcinógenos por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en base a evidencias epidemiológicas y experimentales [74].

Estos compuestos carcinogénicos del tabaco son absorbidos y metabolizados en los individuos fumadores y la respuesta del organismo es la misma que la que ocurre con otro tipo de agente carcinogénico comenzando una serie de reacciones en cascada que dan lugar a cambios y reacciones en el ADN durante su replicación, pudiendo introducirse mutaciones iniciadoras del proceso tumoral [75].

El CP se origina tras una serie de cambios morfológicos que van desde el epitelio normal a la hiperplasia, metaplasia, displasia, carcinoma in situ, cáncer invasivo y finalmente cáncer metastásico. En este proceso se acumulan múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que producen el fenotipo maligno final. Estas anomalías genéticas de las células cancerosas afectan a genes que se agrupan mayoritariamente en dos grupos: oncogenes y genes supresores.

La identificación y caracterización de estas alteraciones moleculares en CP tiene una relevancia extrema a la hora de mejorar y conocer la prevención, detección precoz, tratamiento y paliación de esta enfermedad. El objetivo global es conseguir trasladar todos estos conocimientos moleculares básicos a la clínica en lo que denominamos Oncología Traslacional.

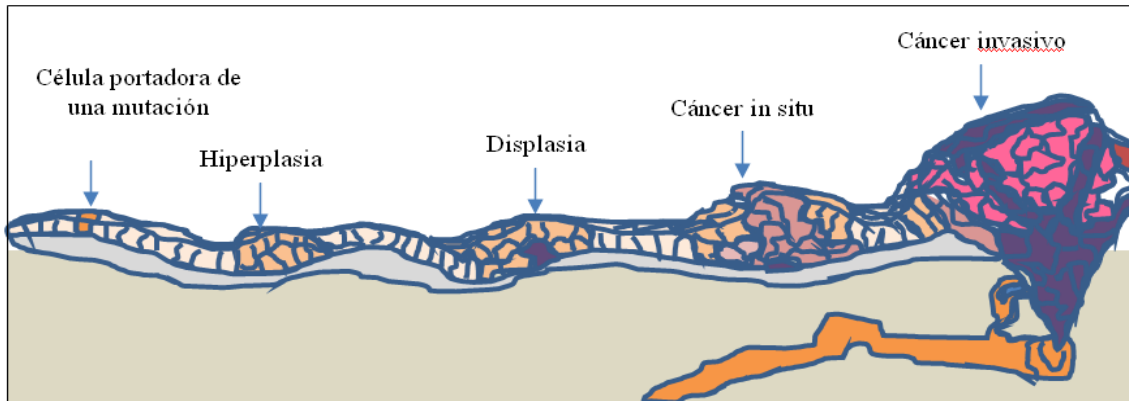


Figura 13: Esquema representativo de los cambios morfológicos que preceden el CP

4.3. Alteraciones genético-moleculares en cáncer de pulmón

4.3.1. Alteraciones genéticas en componentes del ciclo celular: genes supresores de tumores

Son genes recesivos que tienen como función reprimir la división celular, pero además participan muy activamente en la capacidad de respuesta de las células tumorales al daño en el DNA. Por tanto, su alteración, que debe estar presente en ambos alelos del gen conlleva una pérdida de su función, aunque no siempre ocurre esta premisa. Las más frecuentes son pérdidas de heterocigosidad, deleciones homocigóticas, mutaciones puntuales e hipermetilación del promotor.

La proteína **p53** es una de las que más frecuentemente se mutan en cáncer [76, 77, 78]. Su gen, *TP53*, codifica para una proteína nuclear que regula la transcripción. Actúa bloqueando el ciclo celular en la fase G1 para facilitar la reparación del DNA como mecanismo de respuesta a una agresión o bien promueve la apoptosis si el daño es irreparable. En condiciones normales, la proteína p53 se sintetiza cuando existe una lesión en el DNA al que se une para estimular la síntesis de p21 que detiene el ciclo celular en G1 para que actúen las enzimas reparadoras.

Cuando la proteína P53 está mutada, cambia su estructura, no se sintetiza p21 y no se detiene el ciclo celular. Por ello no se reparan las lesiones del DNA y se

acumulan los errores que conducen a la carcinogénesis. En el 80% del CMP y el 50% del CPNM se encuentran mutaciones en *TP53*, la mayor parte localizada en los exones 5 y 8. El 70-80% son mutaciones missense que prolongan la vida media de la proteína y pueden ser detectadas por IHQ. El 20-30% son mutaciones nonsense, deleciones, inserciones o errores en el splicing que no pueden detectarse por IHQ.

Otras de los genes en los que se han descrito alteraciones es en el del retinoblastoma (***RB***). La inactivación de los dos alelos de *RB* se ha detectado en el 90% de los CMP y en un 15-30% de los CPNM [79, 80]. El gen *RB* es un regulador del ciclo celular en fase G0/G1. Su inactivación se produce por fosforilación en la fase G1 por quinasas dependientes de ciclinas. Algunas proteínas como p16, p15 o p21 pueden actuar como reguladores negativos de estas ciclinas.

En la misma vía de señalización de Rb se encuentra **p16**, habiéndose observado hipermetilación de su región promotora en el 30-70% de los CPNM. La inactivación de p16 es más frecuente en tumores de no fumadores que fumadores. También está implicada en la regulación del ciclo celular ya que bloquea el paso de G1 a S. Se localiza en la región cromosómica 9p21, donde son frecuentes las deleciones. La proteína p16 actúa inhibiendo la acción del complejo ciclina D1- CDK4, lo que impide la hiperfosforilación de Rb y, por tanto, se produce una fosforilación continua de Rb que conlleva la progresión del ciclo celular y la transcripción génica [81].

Puesto que Rb y p16 pertenecen a la misma vía de señalización, las alteraciones genéticas entre ellas son excluyentes; esto es, si una está alterada, no lo estará la otra. Las alteraciones génicas no son redundantes en las células cancerígenas, salvo excepciones [82].

Asimismo son frecuentes la pérdida de inhibidores del ciclo p21, p27, así como incrementos en los niveles de distintas ciclinas (ciclina A, B, E, D) y quinasas dependientes de ciclinas (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) que promueven la progresión del ciclo celular.

La apoptosis es la muerte celular programada de una célula ante ciertos daños que son incompatibles con su buen funcionamiento.

Entre las moléculas que regulan estos mecanismos que se encuentren alteradas en CP están p53 y p14 ambas alteradas en los distintos tipos histológicos de CP, también son comunes alteraciones en los niveles de distintas proteínas implicadas en la apoptosis como los reguladores FAS, survivina, NFK- β , etc.

4.3.2. Alteraciones genéticas en vías de transducción de señales bioquímicas: oncogenes

Las alteraciones en estas vías dan lugar a la transmisión de un estímulo de transcripción constante al interior de la célula. Mutaciones en los oncogenes, genes cuya función normal es el estímulo de la proliferación, los mantiene activados de forma constitutiva. Los mecanismos por los que se alteran habitualmente son mutaciones puntuales, amplificación génica, poliploidia o traslocaciones cromosómicas.

En CP las mutaciones en *KRAS*, regulador de señales de transducción y de proliferación celular, son las más frecuentes ocurriendo en aproximadamente en el 30% de los pacientes con CP fundamentalmente adenocarcinomas. Se activa mediante mutaciones puntuales, sobre todo en los codones 12, 13 y 61. Las más frecuentes son transversiones G-T en el codón 12. La proteína se ancla en la cara interna de la membrana citoplasmática y se activa en presencia de estímulos externos. Su misión es transmitir la señal mitógena al interior celular. KRAS activado se une a la proteína RAF quinasa que a su vez activa otra cadena de proteínas que se unen al ADN actuando como factores de transcripción que activan la división celular. Cuando se produce una mutación en KRAS puede cambiar la estructura de la proteína de forma que no responde a los estímulos reguladores y permanece siempre activada, lo que genera una proliferación celular constante.

La familia de ERB-b, un grupo de receptores tirosina-quinasa con sus ligandos, constituye una vía fundamental en CP. El miembro más importante es el *EGFR* o Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal growth factor receptor*), que regula la proliferación epitelial y se ha visto sobreexpresado en la mayoría de los tumores de pacientes con CP. En los últimos años ha habido un renovado interés por esta vía debido al descubrimiento de mutaciones somáticas de *EGFR* en pacientes con CP y sus implicaciones terapéuticas asociadas a estos hallazgos, con la introducción en la práctica clínica diaria de tratamientos dirigidos contra esta vía como los inhibidores de la tirosínquinasa (TKI, del inglés *Tyrosine-kinase inhibitor*) [83, 84, 85]. Las mutaciones de *EGFR* se han descrito en el 10-15% de pacientes caucásicos y en el 30-40% de los países del este asiático [86, 87]. Aproximadamente el 90% de las mutaciones de *EGFR* aparecen en los exones 19 y 21 en la región que codifica el dominio tirosina-quinasa. La más común es la delección del exón 19 y en un segundo lugar una mutación puntual del exón 21 que da como resultado un cambio de una leucina por una arginina en el codón 858 [88, 89].

Se encuentran también implicados en esta vía, los genes de la familia *MYC* (*L-MYC*, *N-MYC* y *C-MYC*) que se activan por un mecanismo de amplificación que determina la sobreexpresión del gen. Esta familia codifica para proteínas nucleares que se unen al ADN regulando la transcripción. Se encuentra en el 10% de los CPNM y en el 80% CMP donde se asocia a peor pronóstico.

TGF- β promueve la inflamación pulmonar y puede unirse a las integrinas que se expresa en las células tumorales. Este factor inhibe el ciclo celular en la fase G1/S e induce la expresión de p21 y c-MYC [93, 94] además afecta a la angiogénesis y participa en la progresión tumoral del CPNM actuando como factor pronóstico de supervivencia en los adenocarcinomas.

4.3.3. Alteraciones genéticas en componentes del ciclo celular: cambios epigenéticos

Las anomalías genéticas están asociadas con cambios en la secuencia del ADN. Sin embargo, los cambios epigenéticos se relacionan con cambios en la expresión génica sin cambios en la secuencia del ADN y por ello son potencialmente reversibles [90].

En CP muchos genes permanecen silenciados por hipermetilación del promotor de genes supresores y también por hipometilación del promotor en caso de oncogenes, ocurriendo precozmente en la tumorigénesis. Estos incluyen desde genes involucrados en la supresión de tumores, invasión tisular, reparación del ADN, detoxificación de carcinógenos del tabaco y en la diferenciación celular. Los recientes avances en este campo han permitido estudiar los patrones de metilación del ADN en CP sugiriendo que el papel de la metilación ha sido infraestimada [91, 92, 93]. Restaurar la expresión epigenética de los genes regulados por metilación es un reto y se convierte en una diana terapéutica.

	CP asociado a Tabaco	CP no asociado a Tabaco
Ganancia del cromosoma p16	< 5%	59%
Mutación de <i>KRAS</i>	30 - 43%	0 – 7%
Mutación de <i>EGFR</i>	7%	45%
Mutación de <i>TP53</i> ; G → T/G	1-5	0-23
Índice de Metilación	Alto	Bajo
Metilación de p16 y APC	Frecuente	Infrecuente
Pérdida de expresión de la proteína hMSH2	Raro (10%)	Común (40%)

Tabla 4: Resumen de las alteraciones genéticas involucradas en la carcinogénesis del CP

En resumen, los genes descritos hasta el momento son probablemente una pequeña parte del conjunto de genes que participan en el desarrollo del CP. Estudios de alteraciones cromosómicas globales basadas en cariotipos, CGH (*Comparative Genome Hybridization*) y otros indican que existen distintos cromosomas que presentan frecuentes ganancias o pérdidas de material genético, lo que sugiere que deben existir oncogenes y genes supresores de tumores todavía por identificar. La citogenética ha aportado muchos datos sobre los cambios cromosómicos somáticos implicados en la patogénesis del cáncer de pulmón. A pesar de su evidente complejidad, hay regiones cromosómicas que se encuentran alteradas con mayor frecuencia bien por ganancia o bien por pérdida.

Finalmente, en los últimos años se está realizando un gran esfuerzo encaminado a obtener datos derivados del estudio genómico y proteómico de los tumores, datos que pueden ayudar a discriminar el pronóstico o a seleccionar un tratamiento. En este sentido el cáncer de pulmón es uno de los más estudiados por su elevada incidencia y mortalidad.

La técnica de tissue microarrays permite estudiar y localizar de forma rápida y precisa muchos cilindros de tejido en una sola sección histológica. En la actualidad su principal aplicación está en la validación de la información generada mediante el estudio de perfiles de expresión. Los arrays de expresión proporcionan información sobre ARNm asociados a la carcinogénesis pulmonar, tanto para identificar grupos de riesgo en pacientes en estadios precoces, como para diferenciar adenocarcinomas de células epiteliales normales e incluso patrones de genes relacionados con la respuesta o la resistencia al tratamiento.

La combinación de las técnicas “ómicas” genera aún más datos que posteriormente deben ser integrados y que pueden proporcionar en el futuro una lista de genes potencialmente utilizables como marcadores diagnósticos.

En definitiva, la descripción de las alteraciones genético-moleculares de los tumores tiene un amplio potencial para el manejo del enfermo de cáncer ya que, en un futuro próximo, podrían ser utilizadas a varios niveles

- Identificación de individuos con predisposición a padecer cáncer
- Nuevos marcadores para el diagnóstico precoz en individuos de alto riesgo
- Posibles marcadores con aplicación en el pronóstico y respuesta al tratamiento del enfermo de cáncer
- Nuevas dianas para el diseño de terapias dirigidas de forma específica a dichas alteraciones

5. ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRACELULARES EN PLASMA

En las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento y desarrollo de las alteraciones genéticas implicadas en el origen del cáncer. A este conocimiento ha contribuido la incorporación de gran número de técnicas, encaminadas al análisis y caracterización de los dos tipos de moléculas más importantes, el ADN y el ARN.

La presencia de ácidos nucleicos extracelulares en plasma o suero de pacientes y sujetos sanos esta bien establecida [94], pero el interés real en este campo comenzó en la década de los 60 con la detección de ADN en el plasma de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico [95, 96]. Estudios posteriores demostraron la existencia de ADN en el plasma de pacientes que sufren diversos trastornos autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias [97, 98], así como en pacientes con patologías benignas de origen gastrointestinal [99]. Por último, el ADN también se encontró en pacientes con diversos tipos de cáncer y en sujetos sanos [97, 100]. Estudios cualitativos han mostrado alteraciones en el ADN y ARN extraído del plasma de pacientes que son similares a las encontradas en ácidos nucleicos del tumor, lo que sugiere que los ácidos nucleicos hallados en plasma podrían tener su origen en células tumorales [101].

El grupo de P. Anker y M. Stroun, fue el primero en definir las características de especificidad tumoral de los ácidos nucleicos en el plasma de los pacientes con cáncer [102]. Este grupo había investigado anteriormente la liberación de ácidos nucleicos desde bacterias en plantas [103], desde aurícula de rana, y desde linfocitos humanos [104], estableciendo posteriormente el origen tumoral de los ácidos nucleicos en el plasma de los pacientes con cáncer, demostrando que las alteraciones genéticas de los ácidos nucleicos coinciden con las de los tumores primitivos de cada enfermo [105].

Los estudios iniciales en plasma se centraron en la determinación de ADN genómico del tumor, y posteriormente, se determinó la presencia plasmática de

ADN mitocondrial circulante, ARN y ácidos nucleicos virales asociados a tumores [106]. La utilización de nuevos métodos para la detección cuantitativa de ácidos nucleicos circulantes ha permitido mejorar su utilidad diagnóstica, pronóstica [107]. También se ha puesto de manifiesto que el ADN del tumor, con las alteraciones genéticas específicas del mismo, está presente en el sobrenadante de los aspirados de médula ósea de pacientes con cáncer de mama precoz [108]. Se determinó que la sensibilidad asociada a esta localización era superior al análisis de ADN circulante tumoral en el suero de las mismas pacientes. La naturaleza de este procedimiento tiene el inconveniente de ser más invasivo, aunque demuestra que el análisis del ADN extracelular del tumor puede ser equiparable al estudio de la célula tumoral circulante en sangre, basado en la detección de ADN específico tumoral.

En la actualidad es posible detectar ARN libre en plasma aún con niveles basales muy bajos [100], pero que puede alcanzar un notable incremento en los enfermos con algún tipo de neoplasia. Se consideraba al ARN circulante como muy inestable y de muy rápida degradación por las nucleasas plasmáticas, lo que limitó su estudio durante varios años con respecto al del ADN circulante. Sin embargo, se pudo demostrar que es extraíble y amplificable [109], haciendo posible su análisis molecular.

Aunque actualmente existe un mejor conocimiento acerca de los mecanismos de liberación de los ácidos nucleicos libres en plasma y sobre su posible origen, sigue siendo necesario un mayor estudio de los mismos.

Respecto de su origen existen varias hipótesis para poder explicarlo: en primer lugar, se consideró que los ácidos nucleicos libres en plasma podían derivar de la lisis de células tumorales circulantes, aunque esta teoría se descartó como única ya que es posible encontrar ácidos nucleicos libres en plasma sin evidencia de enfermedad. Además se demostró que cerca de 1.000-10.000 células circulantes libres en plasma por ml de sangre [110] serían necesarias para justificar el ADN tumoral en plasma. Este es un número mucho mayor de células tumorales circulantes que las que habitualmente se encuentra en sangre periférica [111].

En segundo lugar, se intentó explicar la presencia de ácidos nucleicos tumorales en plasma en relación con el proceso de apoptosis en el seno del tumor [112]. Varios estudios mostraron que el patrón del ADN que se encuentra en plasma es similar al patrón del ADN mostrado por las células apoptóticas [113, 112]. Sin embargo la apoptosis es un mecanismo que se pierde inicialmente en los procesos neoplásicos [114] por lo que también se consideró que esta hipótesis no explicaría totalmente el fenómeno.

En tercer lugar se admite la posibilidad de que la necrosis tumoral fuera la responsable de la presencia de ácidos nucleicos circulantes en plasma. Sin embargo, se ha observado que los niveles plasmáticos de ADN disminuyen de forma considerable en pacientes con carcinoma nasofaríngeo con buena respuesta a la radioterapia, y no disminuyen cuando la respuesta es mala, presumiblemente porque el tumor sigue en actividad [115]. Estas observaciones no apoyan la teoría de la necrosis tumoral como fuente de ADN libre en plasma, ya que lo esperado con la necrosis sería un aumento de ADN en plasma.

También, se sugirió que procesos de liberación activa como ya habían sido descritos en linfocitos [104], pudieran ser los responsables de esta presencia de ácidos nucleicos circulantes en el plasma de los pacientes con cáncer.

Sin descartar absolutamente ninguna de las hipótesis previas, se han continuado buscando causas que expliquen la estabilidad e incremento del ARN circulante en pacientes con enfermedades tumorales [116, 108]. La liberación de vesículas que contienen ARN, procedentes de células tumorales en ensayos "*in vitro*", fue descrito por varios autores [117, 118]. El descubrimiento de complejos lipoproteicos circulantes unidos a ARN en el plasma de pacientes con neoplasias hace factible que exista este mecanismo espontáneo descrito de liberación, mediante posibles vesículas que ofrecieran una resistencia a la acción de las nucleasas [119, 120].

Así, se especuló con la posibilidad de que la liberación de exosomas (microvesículas cuyas características físico químicas se comentan en el punto siguiente) por distintos tipos celulares, pudiera relacionarse con la llegada de ácidos nucleicos libres al plasma. Los exosomas participan en varias funciones, como la maduración de reticulocitos [121], la presentación de antígenos o el intercambio genético entre células.

5.1. MicroARNs circulantes en plasma

Los microARN (miARN) representan un grupo de ARN no codificantes de secuencia corta (18-25 nucleótidos) que ejercen importantes funciones reguladoras postranscripcionales. Existen numerosos estudios donde se demuestra que la expresión de los miARN se encuentra alterada en cáncer, de manera que la sobreexpresión o la regulación negativa de estas moléculas se asocia de forma específica con el desarrollo de distintos tipos de neoplasias.

Los miARN son transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa II, que origina un miARN primario (pri-miARN) [122]. Los pri-miARN forman estructuras secundarias de horquilla que son cortadas por la enzima Drosha ayudada por su cofactor Pasha, y originan el precursor del miARN (pre-miARN). Los pre-miARN son transportados desde el núcleo al citoplasma por la proteína exportina 5 y en el citoplasma son procesados a miARN cortos (22 nucleótidos) de doble cadena por la ARNasa de tipo III Dicer. Los miARN maduros se incorporan en los complejos efectores miRISC y es entonces cuando se forman los miARN maduros de cadena sencilla [123].

Mientras una cadena se mantiene incorporada en el complejo RISC (donde ejercerá su función de silenciamiento), la otra cadena se degradará. El mecanismo por el cual un miARN ejerce su función depende del grado de complementariedad entre el miARN y la región 3'-UTR de su ARN mensajero (ARNm) diana. Si la complementariedad entre ambas secuencias es completa, el ARNm diana será degradado por RISC.

Sin embargo, si el emparejamiento entre las bases no es perfecto, como ocurre con la mayoría de los miARN de mamíferos, se producirá la inhibición de la traducción [124].

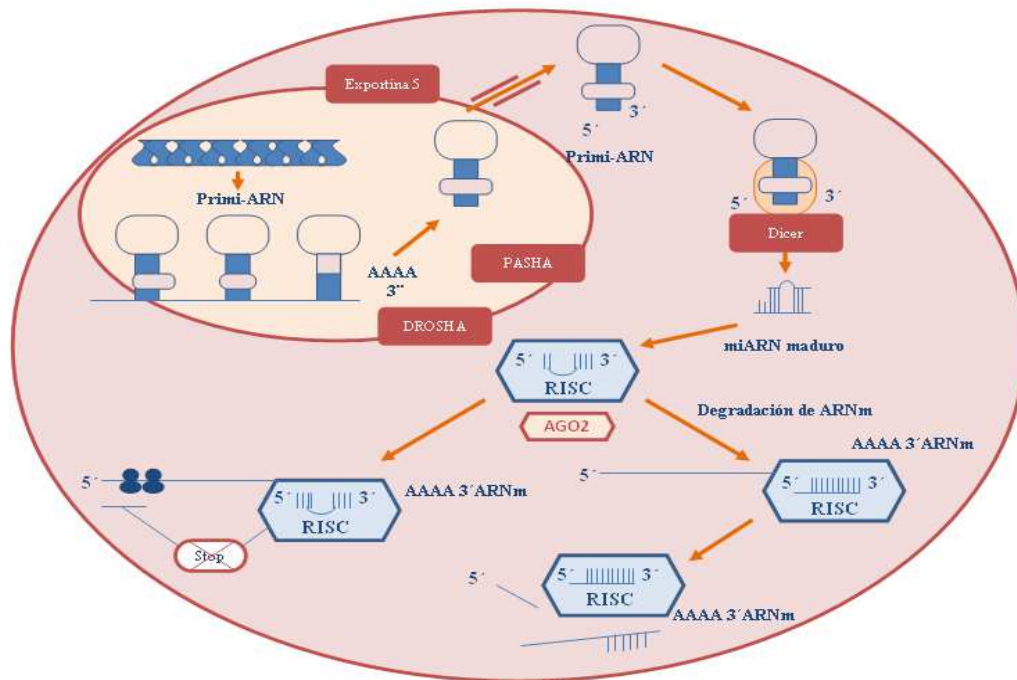


Figura 14: Biogénesis y mecanismo de acción de los microARN.

Un miARN puede tener muchos ARNm diana y cada ARNm puede estar regulado por varios miARN. En estudios bioinformáticos se ha estimado que los miARN pueden regular hasta el 30% de todos los genes humanos.

La primera evidencia que implicó a los miARN en el desarrollo de cáncer se derivó de un estudio en leucemia linfática crónica (LLC), en el cual se demostraba que 2 miARN (miR-15a y miR-16a), localizados en la región cromosómica 13q14, estaban infraexpresados en el 68% de los pacientes con LLC [125]. Además, estos miARN silenciaban el factor antiapoptótico BCL-2, lo cual indicaba que la ausencia de expresión de estos miARN en LLC inhibía la apoptosis mediante reactivación de BCL-2. La familia de let-7 desempeña un papel crucial en el desarrollo del cáncer de pulmón. Yanaihara y col. [126] identificaron que su expresión se encontraba

reducida en este tumor y la sobreexpresión de let-7 inhibía el crecimiento tumoral a través de la regulación de los oncogenes *RAS* y *c-MYC*.

La función de los miARN no es solo la inhibición de la traducción, sino que en condiciones de parada celular algunos miARN pueden potenciar la traducción de algunos ARNm. Además las funciones de los miARN pueden verse afectadas o modificadas a lo largo del ciclo celular.

En estudios posteriores se ha demostrado que alteraciones en la expresión de miARN pueden detectarse en todo tipo de tumores. Incluso, Lu y col. [127] demostraron que los patrones de expresión global de miARN pueden clasificar los tumores de una forma mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión de ARNm.

En los últimos años se han acumulado numerosas evidencias que han demostrado la implicación de los miARN en el desarrollo de muchas neoplasias actuando como oncogenes o genes supresores de tumores. En condiciones normales en la célula, los miARN oncogénicos son expresados a bajos niveles mientras que los supresores de tumores a niveles normales. Variaciones de expresión de estos tipos de miARN podrían favorecer la proliferación celular no controlada.

Parece evidente que a medida que aumenta nuestro conocimiento sobre la biología de este mecanismo de regulación génica, mejorarán nuestras posibilidades para utilizar los miARN como marcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta a fármacos.

En 2008 se reportó el hallazgo de miARNs en el suero y plasma de pacientes, estos se encuentran de forma estable y protegidos de la actividad de ARNasas endógenas en la circulación sanguínea [128]. Estas características son deseables en biomarcadores potenciales para el uso clínico, y rápidamente se encontraron evidencias de que los miRNAs séricos podrían ser biomarcadores potenciales para el diagnóstico de neoplasias malignas como el cáncer colorectal u ovario [129].

Recientemente se han analizado perfiles de expresión de miARNs en pacientes con CP para evaluar el potencial uso como diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. El estudio de Chen y col., realizado en una población asiática, identificó el miR-25 y miR-223 séricos como candidatos a biomarcadores que permitían distinguir los individuos con CP de los sanos del grupo control [130].

Otro estudio realizado en 2010 reportó que en conjunto los miARNs del suero de pacientes con CP, ovárico y de próstata podrían ser empleados para discriminar los pacientes sanos de los afectados de cáncer. Sin embargo, este estudio usó únicamente dos muestras de CP [131]. El estudio realizado por Seller y col., reportó que los niveles de 24 miARNs provenientes de la fracción celular de sangre periférica de pacientes con CP estaban alterados con respecto a pacientes sanos [132].

Por último Hu y col., realizaron un estudio de secuenciación de los miARNs contenidos en el suero de 60 pacientes con CP (30 pacientes que habían logrado larga supervivencia y 30 pacientes de corta supervivencia) en una población de origen asiático. Este estudio concluyó que los niveles séricos elevados de miR-486 y miR-30d así como niveles bajos de miR1 y miR-499 estaban asociados a peor pronóstico [133].

En cuanto a la liberación de dichas moléculas desde las células tumorales a la circulación, se demostró que la mayor parte se encuentran protegidas por nanovesículas. Otros estudios además sugieren que los miRNAs contenidos en nanovesículas son funcionantes y son capaces de realizar funciones en la célula diana [134]

Por tanto, la existencia de miARNs circulantes nos abre enormes posibilidades para su utilización como marcadores de diagnóstico, pronóstico de diferentes enfermedades y respuesta a fármacos de las mismas, así como una potencial fuente de información para estudios futuros en diversas patologías.

6. EXOSOMAS

En base a lo expuesto sobre la posibilidad de que exosomas, o bien estructuras similares estuviesen vehiculizando el ARNm en el plasma motivó que se realizaran estudios en pacientes con cáncer, con el objetivo de detectar su presencia en el plasma en condiciones fisiológicas.

En uno de estos estudios [135] se utilizaron varios procedimientos moleculares, para demostrar que una importante fracción de ARN en plasma estuviese protegida por partículas asociadas y, cuyo origen fuese similar al de los exosomas. Muestras de plasma de pacientes con cáncer de colon y células en cultivo fueron sometidos a incubaciones con anticuerpos, ultracentrifugación y extracción de ARN según protocolo para ARN total, ARN epitelial y ARN mensajero con el fin de analizar la naturaleza de estas moléculas. Se utilizaron técnicas de imagen como citometría de flujo y microscopía láser confocal. Se observó que después de la incubación de plasma con microesferas recubiertas de anticuerpos epiteliales todos los ARN mensajeros detectados se unían a estos restos epiteliales.

6.1. Definición y características de los exosomas

Los exosomas son pequeñas vesículas de 50 a 100 nm que contienen material genómico y diferentes proteínas en su interior, y que son liberadas por las células mediante un complejo mecanismo ante diferentes estímulos.

Actualmente se conocen distintos tipos de pequeñas vesículas cuya estructura y función son diferentes al de los exosomas, por ello, su identificación a lo largo de los años se ha visto en ocasiones dificultada por problemas taxonómicos [136]. Mediante microscopia se ha podido observar que los exosomas tienen una morfología ligeramente alargada y están limitados por una bicapa lipídica. Además, presentan un rango de densidad que oscila entre 1.13g/ml (para exosomas derivados de células B) y 1.19g/ml (para exosomas derivados de células intestinales).

Originalmente se pensó en las primeras observaciones que la función principal de los exosomas era la eliminación de moléculas de superficie, sin embargo, trabajos posteriores han demostrado la importancia de los exosomas para la biología y la investigación molecular en diferentes campos. Es por ello, por lo que existe un manifiesto interés en el estudio de los exosomas y de su función en el cuerpo para desarrollar aplicaciones clínicas en el diagnóstico y tratamiento.

La nomenclatura para definir los distintos tipos de vesículas extracelulares continúa siendo actualmente materia de debate en la comunidad científica.

La identificación de pequeñas vesículas que se liberan de la superficie de muchos tipos celulares ha sido conocida desde hace décadas. Históricamente el término “exosoma”, “vesículas similar a exosoma”, “micropartícula”, “cuerpos apoptóticos”, “micropartícula apoptótica” han sido empleados de forma sinónima. Sin embargo, esta terminología no distinguía claramente la entidad que se quería definir.

De esta manera, se trató de diferenciar las diferentes vesículas del organismo por su tamaño, densidad, fuente y su proceso de formación [137]. En la siguiente tabla se expone a modo de resumen las diferencias entre las distintas vesículas conocidas en el organismo.

Característica	Exosomas	Microvesículas	Ectosomas	Partículas de membrana	Párculas similares a exosomas	Vesículas apoptóticas
Tamaño	30-100nm	100-1.000nm	50-200nm	50-80nm	20-50nm	50-500nm
Densidad en sacarosa	1,13-1,19 g/ml	ND	ND	1,04-1,07 g/ml	1,1 g/ml	1,16-1,28 g/ml
Apariencia en microscopio electrónico	Ligeramente alargada	Forma irregular	Estructura redonda bilaminar	Forma redondeada	Forma irregular	Heterogénea
Sedimentación	100.000 g	10.000 g	160.000 g-200.000 g	100.000 g-200.000 g	175.000 g	1,200 g 10,000 g 100,000 g
Composición lipídica	Enriquecido en colesterol esfingomielina y caramida contiene balsas lipídicas exporen fostatidilcoina Tetraspaninas (CD63, CD9) Alix y TSG101	Exponen fostatidilcoina	Enriquecido en colesterol y diacilglicerol; exporen fostatidilcoina	No determinado	No contiene balsas lipídicas	No determinado
Principales marcadores	Tetraspaninas (CD63, CD9) Alix y TSG101	Integrinas selectinas y CD40 ligando	CR1 y enzimas proteolíticas; no CD63	CD133; no CD63	TNFR1	Histonas
Origen intracelular	Compartimentos internos (endosomas)	Membrana plasmática	Membrana plasmática	Membrana plasmática	Compartimentos internos	No determinado

Tabla 5: Características físico-químicas de los diferentes tipos de vesículas secretadas

El término para estas micropartículas fue acuñado por primera vez por Trams y col. en 1981 [138] para definir unas vesículas secretadas por diferentes líneas celulares con actividad enzimática. Dos años después, el proceso de liberación de esas pequeñas vesículas fue descrito en reticulocitos de ratas [139]. Poco después, un estudio de microscopia electrónica publicaba la exocitosis de unas partículas de 50 nm por eritrocitos de ovejas demostrando de esta manera, que su génesis provenía de la fusión de cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés, multivesicular bodies) con la membrana plasmática para luego secretarse en forma de cuerpos intraluminales (ILVs, del inglés, intraluminal vesicles) denominados exosomas [140].

Johnstone y col. fueron los primeros en aislarlos y definir sus múltiples actividades celulares [141]. El grupo de Raposo observó similitudes entre los MVBs y los lisosomas [142]. Estas similitudes fueron investigadas por Simons y col. [143], que mostraron que los esfingolípidos jugaban un papel clave en la génesis de los exosomas pero no en la de los lisosomas. Aunque el que eran portadores de diversas proteínas fue aceptado por la comunidad científica, la demostración del transporte de ARN que realizan no fue hasta mucho más tarde, en el año 2007, cuando Valadi y col. publican la primera demostración de la presencia de material genético en su interior [144]. Este hecho tuvo una relevancia en cuanto a que el ARN presente en estas vesículas es capaz de regular la expresión génica en las células receptoras [145, 146].

En los últimos años hemos asistido a otro hecho significativo y es la demostración de que los exosomas y el resto de las vesículas extracelulares, presentan como parte de su contenido ADN mitocondrial, ADN de hélice sencilla, ADN de doble hélice y oncogenes. [147, 148]. El significado biológico que podamos aportar a estos hallazgos es aún incierto, pero nos incita a seguir explorando en el conocimiento del potencial clínico- biológico de estas vesículas.

Los exosomas son secretados por multitud de células del organismo, como por ejemplo por células de origen hematopoyético, células dendríticas, mastocitos, células T, plaquetas, células intestinales, células tumorales y células de origen neuronal.

Además han sido hallados en distintos fluidos biológicos tales como plasma [149, 150, 151, 152] orina [153], saliva [154, 155], efusiones tumorales [156], leche materna [157, 158], calostro [158], líquido amniótico [159], fluido uterino [160,161], líquido ascítico [162,163], líquido cefalorraquídeo [164], líquido sinovial [165, 166] lavado broncoalveolar [167,168], excrementos[169, 170], bilis [171] y semen [172].

6.2. Biogénesis de los exosomas

El proceso molecular exacto de la génesis de los exosomas no se conoce con exactitud, permaneciendo como objeto de estudio e investigación y sólo ahora comienza a ser revelado. Este proceso puede ser dividido en 4 fases: iniciación, endocitosis, formación de cuerpos multivesiculares y secreción exosómica.

Los exosomas son generados en los denominados cuerpos multivesiculares como vesículas intraluminales. Durante algún tiempo estos MVBs pueden ser almacenados en el citoplasma, más tarde y en respuesta a diferentes estímulos se desplazan hacia la superficie de tal manera que estos MVBs se fusionan con la membrana plasmática [173] para liberar la carga de ILVs (ahora exosomas) al medio extracelular.

Por tanto, el producto de secreción abandona la célula sin producir solución de continuidad con la membrana plasmática de la misma. Los exosomas son por tanto las vesículas intraluminales que contenían los endosomas liberados ya al espacio extracelular.

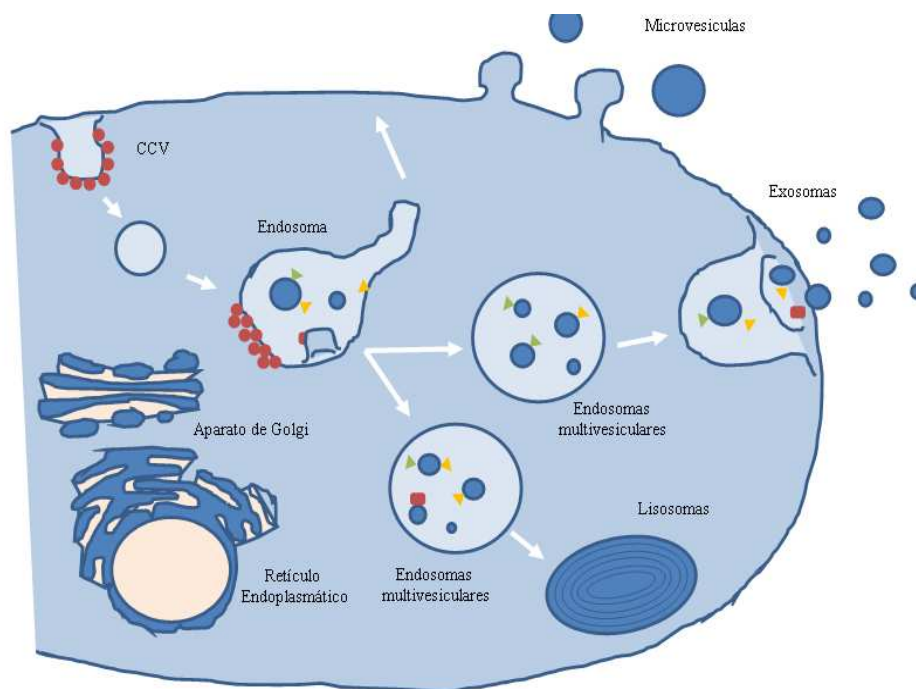


Figura 15: Exosomas secretados al medio extracelular tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana.

La formación de los endosomas multivesiculares implica la segregación del contenido de los futuros exosomas sobre una región de la membrana endosomal y la posterior invaginación de vesículas de tamaño variable hacia el lumen de un endosoma temprano.

A diferencia de los MVBs destinados a la degradación en lisosoma, aquellos que se fusionarían con la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en colesterol. Sin embargo, existen evidencias de que la maquinaria involucrada en la formación de MVBs destinadas a lisosomas (ruta degradativa) también participa en la formación de los MVBs destinados a exocitosis (ruta exocítica). El mecanismo de direccionamiento de las proteínas hacia los MVBs se encuentra muy conservado, y se organiza en cuatro complejos multiproteicos denominados complejos clasificadores endosomales responsables del transporte o ESCRT-0, -I, -II y -III (del inglés, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*, ESCRT).

Aunque no se conoce bien el mecanismo, se ha descrito que la ubiquitinación tiene un papel importante en el direccionamiento de proteínas a ILVs. Este proceso es mediado por el complejo ESCRT [174]. Sin embargo, también han sido propuestos mecanismos independientes al complejo ESCRT, en los que intervienen por ejemplo las tetraspaninas y la esfingomielinasa.

No se cuenta aún con una descripción completa de los mecanismos por los cuales se generan los MVBs, tanto dependientes como independientes de ESCRT, y cuanta colaboración existe entre ellos.

6.3. Secreción de exosomas al espacio extracelular

Una vez formados los MVBs, estos deben dirigirse hacia la periferia celular y fusionarse con la membrana plasmática para liberar su contenido y secretar los exosomas. Estudios del grupo de Thery y col. ponen de manifiesto la importancia de unas proteínas de la familia RAB GTPasas en la regulación de la vía secretora de

los exosomas, teniendo un papel regulador en el transporte intracelular entre los diferentes compartimentos y en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática [175]. La primera vez que se describió la proteína Rab11 como implicada en la secreción de exosomas fue en la línea celular de eritroleucemia K562 [176].

Años más tarde, en oligodendrocitos y en células HeLA, se describió que las proteínas Rab25 y Rab27/Rab27b, respectivamente, controlaban diversas etapas de la vía de secreción de exosomas. Varios estudios han descrito que una pérdida en la expresión de Rab27a y Rab27b lleva consigo una reducción del 50% en la secreción de exosomas [177]. Otro miembro de dicha familia, Rab35 ha sido involucrada en la regulación de la secreción exosomal, gracias a su interacción con proteínas de la familia TBC1 con actividad GTPasa, en concreto con la 10A-C [178, 179, 180].

Se sabe que la familia de las proteínas *SNAREs*, (del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein*) son las encargadas de regular el paso final de la fusión de los MVBs con la membrana plasmática, aunque se desconoce la maquinaria celular implicada [181]. La secreción de exosomas se produce de manera constitutiva pero puede verse regulada en respuesta a los distintos estímulos internos como el aumento del Ca^{2+} intracelular. La secreción de exosomas también puede ser estimulada por factores exógenos como el estrés por radicales libres, la radiación UV [182] y el descenso de la cantidad de colesterol en la membranas [183].

Por último, pocos estudios se han llevado a cabo sobre la interacción de los exosomas con la célula diana receptora para así poder ejercer su función biológica. Aunque todavía el mecanismo es desconocido, se ha propuesto los siguientes: (i) endocitosis mediada por el receptor, (ii) adhesión a la superficie celular, (iii) fusión con la membrana plasmática y (iv) fagocitosis [184].

6.4. Composición molecular de los exosomas

El contenido de los exosomas ha sido analizado por diferentes técnicas como electroforesis, y espectrofotometría de masas, si bien es cierto que con el avance de las técnicas “ómicas”, genómicas y proteómicas, han permitido aumentar la capacidad para identificar nuevos elementos moleculares incluidos en los exosomas. La composición molecular de los exosomas varía dependiendo del origen de las células de las que deriven, no obstante, tienen componentes comunes existiendo diversos estudios que identifican un patrón proteico común [185].

Sus principales contenidos son:

6.4.1. Lípidos

La composición lipídica de los exosomas depende de forma directa de la célula de la que provienen, aunque existe también parte constitutiva conservada de forma general en los exosomas [186].

Estudios extraídos de exosomas de diferentes células han mostrado que la membrana de los exosomas portan lípidos enriquecidos en Ácido Lisobifosfatídico (LBPA), esfingolípidos, colesterol, glicerofosfolípidos y ceramidas, lípidos de tipo rafts que exponen en la cara externa de la bicapa fosfatidilserina [187].

Diversos estudios sugieren que algunos tipos de lípidos están implicados o regulan la formación y liberación de vesículas extracelulares [188]. Además los lípidos activos (eicosanoides, ácidos grasos y colesterol) pueden ser transferidos entre las células a través de las vesículas extracelulares [189].

Se necesitan más estudios en lipidómica del gran abanico de vesículas extracelulares aisladas de diferentes tipos celulares, para esclarecer el papel de la composición lipídica de las mismas y su implicación en la biogénesis y en las funciones de dichas vesículas.

6.4.2. Proteínas

La identificación de proteínas celulares que forman parte de los exosomas se realiza mediante diversas técnicas con Western Blott o citometría de flujo. Sin embargo los estudios de espectrometría de masas son los que han permitido identificar otras proteínas que no habían sido descritas anteriormente como componentes de los exosomas. Estos estudios se han llevado a cabo en exosomas de cultivos celulares, y en aquellos procedentes de materiales biológicos tan diversos como orina, plasma, leche materna o líquido amniótico.

La composición proteica de los exosomas varía dependiendo del tipo celular, sin embargo, existen proteínas comunes que se repiten en diferentes estudios proteómicos y parecen estar presentes independientemente del origen celular de los exosomas estudiados. Mathivanan y col. han revisado recientemente los datos obtenidos de 19 estudios proteómicos de exosomas de diferente origen [190].

Protein name	Times identified
Proteína de choque térmico Hsp70	27
CD63/ Tetraspanina – 30	27
B-Actina	24
Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa	20
Complejo Mayor de Histocompatibilidad, clase II, DR Alfa	18
Enolasa 1	18
CD81/Tetraspanina - 28	18
Proteína de choque térmico Hsp90	17
CD9	17
Anexina A2	16
Tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa proteína, zeta polipeptido	15
Moesina	15
Piruvato quinasa muscular	14
Proteína interactiva 6 de programación de muerte celular	14
Factor eucariota de traslación elongación alfa 1 1	14
Cofilina 1	14
Proteína de unión Syndecan	13
Peptidilprol isomerasa A	13
Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I, E	13
Actina, gamma, citoplasmica 1	13
Tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa proteína de activación, epsilon polipeptido	12
Fosfoglicerato quinasa 1	12
EGF factor 8 proteína	12
Anexina VI	12
Aldolasa A, fructosa- biofosfato	12

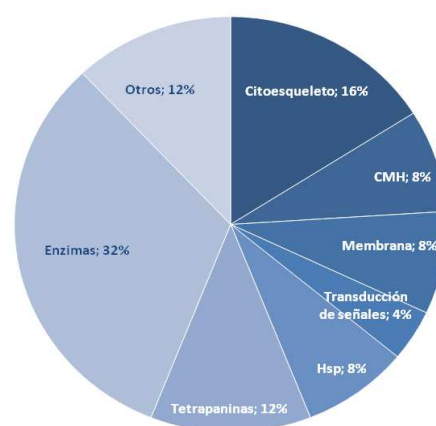


Figura 16: Las 25 proteínas más representadas en los exosomas

Las proteínas encontradas más frecuentes son las siguientes:

- Proteínas que regulan el acoplamiento del exosoma y fusión de membranas. La familia de las proteínas RAB GTPAasas tales como Rab5a, Rab11, Rab27b, Rab35, también denominadas como los receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNAREs, del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein*). Han sido identificadas en diversos estudios hasta 40 proteínas RAB. Se incluyen en este apartado también las anexinas I, II, V y VI que pueden regular las funciones del citoesqueleto y los procesos de fusión de las membranas.
- Proteínas citosólicas presentes en los lisosomas que incluyen estructuras que favorecen los procesos de escisión y de fusión de la membrana de los exosomas, como actina, flotilina, vimentina, miosina y tubulina.
- Proteínas que intervienen en los procesos de biogénesis de los MVBs, tales como ALIX, TSG101 y clatrina.
- Proteínas encargadas de la adhesión celular; ICAM-1, CD146, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD166 y LFA-3/CD58.
- Chaperonas, incluyendo proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 que pueden facilitar la incorporación de péptidos dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).
- Moléculas de adhesión como las tetraspaninas, una de las familias más representadas en los exosomas. Destacamos CD63, CD81, CD82 y CD9.
- Enzimas metabólicas (enolasa, aldolasa, ATP citrato liasa, ácido graso sintasa)
- Proteínas asociadas a las lípidos-rafts o vacuolas lipídicas; Flotilina-1, citoquinas

Algunas de estas proteínas descritas (CD 63, CD9, CD 81, ALIX, TSG101, HSC70) están presentes de manera específica en los exosomas por lo que se definen como “marcadores exosómicos”.

6.4.3. Material genético: ARN y DNA

Valadi y col, fueron los primeros en descubrir ARN en exosomas. Sus estudios de microarrays en mastocitos pusieron de manifiesto por vez primera la demostración de que los exosomas portaban material genético en su interior. Objetivaron más de 1300 ARNm así como miARNs en el interior de los exosomas como let 7 let-7, miR-1, miR-15, miR16 y miR-375. También describieron la transferencia de ARNm y microARNs contenidos en exosomas secretados por mastocitos a células receptoras, modulando de esta manera sus niveles de expresión génica ya que podían traducirse a proteínas [191].

Posteriores trabajos fueron publicados en la misma línea. Taylor y col. utilizó muestras de adenocarcinoma de ovario para determinar la cantidad de miARNs presente en los exosomas. Se demostró que existía mayor cantidad de ARN en el suero de pacientes enfermos que sanos, postulando que según avanzaba la enfermedad la cantidad era mayor [192].

El mecanismo por el que el material genético y las moléculas de ARN se almacenan en las microvesículas no se conoce con exactitud. Es posible que existan ciertos motivos en las secuencias de los microARNs que sean reconocidos por ribonucleoproteínas, etiquetándolos con este destino.

Recientemente también se ha demostrado la presencia de ADN en exosomas. Todos estos hechos nos ponen de manifiesto la importancia de identificar moléculas específicas que se encuentren selectivamente en exosomas con el fin de determinar el efecto biológico que tendrán después en la célula receptora.

Los resultados obtenidos en numerosos estudios sobre la composición molecular (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) de los exosomas se recoge en una base de datos de libre acceso denominada “ExoCarta” (www.exocarta.org). A día de hoy esos datos se han ampliado y combinado con otros pertenecientes a un abanico de vesículas secretadas en un compendio (“Vesiclepedia”) cuyo objetivo es sentar unas bases acerca de las normas de nomenclatura y los métodos de purificación de los diferentes tipos de vesículas extracelulares (www.exocarta.org/vesiclepedia).

6.5. Función de los exosomas

Los trabajos publicados en la literatura han demostrado cómo estas vesículas tienen un papel importante en funciones y procesos celulares que incluyen la transmisión de señales produciendo la interacción con otras células a través de receptores específicos además de funciones en los procesos de inflamación, coagulación y diseminación tumoral.

Los últimos estudios y avances relacionan estas vesículas con otras importantes funciones biológicas que incluyen la transmisión de ARN a diferentes células diana del organismo. A consecuencia de todas estas propiedades, los exosomas están claramente involucrados en los procesos de coordinación siendo un elemento clave para la mantener homeostasis celular y modificar el entorno.

Así, en el estudio llevado a cabo por Valadi y col. se mostraba que los exosomas están enriquecidos con ARN mensajero y microRNA. Los exosomas de líneas celulares tanto humanas como de ratón son capaces de transportar ARN a mastocitos adyacentes y ser traducido, lo cual indica que el ARN transferido es biológicamente activo. Este ARN puede conferir nuevas funciones a las células. Sorprendentemente, la incubación de células humanas con exosomas de células de ratón dio lugar a la producción de proteínas de ratón a partir de ARNm presente en los exosomas de ratón.

Sin embargo, el ARNm de exosomas procedentes de mastocitos fue transferido a otros mastocitos pero no a células T. Así, la transferencia horizontal de material genético es específica ya que depende del empaquetamiento que tiene lugar en el exosoma y la célula a la que se transfiere el ARN [191].

6.5.1. Exosomas en la comunicación intercelular

Los exosomas forman parte del espacio intercelular y ejercen una función reguladora como mecanismo de comunicación intercelular. A pesar de las escasas evidencias de sus funciones in vivo, los exosomas constituyen una nueva vía de comunicación compartida por numerosos tipos celulares. Existen ejemplos de cómo distintos tipos celulares son capaces de secretar exosomas para poder facilitar las funciones de cada tipo celular.

Un estudio reciente describe la importancia de los exosomas en la comunicación intercelular en la piel. Los queratinocitos de la epidermis secretan exosomas que contactan con los melanocitos vecinos modulando la pigmentación, esto es, incrementando la expresión y la actividad de las proteínas melanosomales, lo que produce un aumento de la síntesis de melanina. [193].

6.5.2. Exosomas como facilitadores de la respuesta inmune

El papel de los exosomas como presentadores de antígenos está ampliamente documentado al corresponder a las primeras funciones documentadas del origen de estas vesículas. Forman un papel clave en la inmunidad celular, a través de la presentación antigénica y la regulación inmunológica a la misma. Se sabe de la importancia que tienen los efectos del sistema inmune en el desarrollo y la progresión de determinados tumores, en los que la determinación y cuantificación de exosomas podría suponer un mecanismo de regulación y control de esos procesos. A su vez podría ser fuente de antígenos tumorales a la hora de diseñar vacunas antitumorales [194].

6.5.3. Exosomas como mediadores de la respuesta inflamatoria

Las funciones de los exosomas se han visto también en los epitelios de diferentes tejidos como el sistema nervioso y sistema digestivo. Asimismo, en el epitelio de la vía aérea se ha visto que los exosomas presentes en el LBA son capaces de incrementar la secreción de citoquinas presentes en el epitelio de personas afectas de enfermedades como el asma [195].

6.5.4. Papel en la transferencia de agentes infecciosos a células diana

Los retrovirus y los exosomas comparten características comunes por su habilidad para utilizar la misma maquinaria celular y ambos ser liberados al medio extracelular mediante fusión con la membrana celular. Se postula que en el modelo de propagación celular de los virus, los exosomas formen parte activa mediante la propagación de los mismos en su interior.

Estudios recientes han revelado un papel inesperado de los exosomas en la propagación de priones. Las enfermedades por priones producen alteraciones neurodegenerativas afectando tanto a humanos como a animales. El grupo de Raposo y col. ha demostrado que la proteína priónica pR_p en sus diferentes isoformas utiliza los MVBs para ser liberadas en exosomas [196].

6.5.5. Papel en el intercambio de proteínas patógenas

Otra de las funciones aceptadas y demostradas es el intercambio de proteínas que están reconocidas como potencialmente patógenas, tales con péptido β - amiloide y α -sinucleína. [197]. Este mecanismo podría contribuir a facilitar la transmisión de las enfermedades neurogenerativas de las que son responsables. En un contexto fisiológico, varios tipos celulares del sistema nervioso central, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos liberan exosomas que participan en la comunicación interneuronal y en el sostenimiento de la integridad de las neuronas [198].

6.5.6. Papel en procesos biológicos como la fertilización y el desarrollo embrionario

Los prostasomas parecen jugar un papel importante en la protección del espermatozoide frente al pH ácido de la vagina, aumentando la motilidad del espermatozoide y retrasando la reacción del acrosoma [199].

6.5.7. Papel en la reparación y crecimiento de tejidos

Se ha podido documentar exosomas secretados por células madre de tejidos neuronal, epitelial y muscular. Los exosomas liberados por las células madre de estos tejidos parecen contribuir a la regeneración de los tejidos, contribuyendo de esta manera a la reparación y regeneración de los tejidos [200]

6.6. Exosomas y cáncer

Los exosomas son liberados por muchos tipos de células, pero la mayoría de los estudios están focalizados en los exosomas secretados por reticulocitos, células del sistema inmune y células tumorales [201]. Análisis proteómicos de microvesículas han revelado que numerosas moléculas son compartidas por diferentes microvesículas de diferente origen celular, sin embargo el exosoma funcionalmente parece estar determinado por el contenido proteico específico de la célula de origen.

La liberación de exosomas está incrementada en las células tumorales, tal como se demuestra en estudios donde existe abundante concentración de los mismos en plasma, ascitis y derrames pleurales de pacientes con cáncer [202].

La presencia de determinadas proteínas y ácidos nucleicos en los exosomas podrían ser muy útiles como **biomarcadores para el diagnóstico** de distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. La presencia de estos en los distintos fluidos orgánicos tales como la sangre, orina, LBA, líquido ascítico, amniótico hace posible plantearse la posibilidad de detectarlos como método diagnóstico, pronóstico y

predictivo en diversas enfermedades. Los exosomas también podrían ser usados como biomarcadores en enfermedades infecciosas y podrían ayudar a definir mejor el tratamiento de ciertas patologías aunque esto aún no ha sido confirmado.

Los exosomas tienen un papel relevante como mediadores en la **comunicación intercelular** tumoral, existiendo cada vez más evidencia del papel central que juegan en este contexto. Son capaces de transferir proteínas y ARN a otras células, y de esta manera regulan vías de activación tumoral. Por ejemplo, se ha demostrado que los exosomas son capaces de bloquear la vía celular Wnt-catenina gracias al transporte de β -catenina, realizando una inhibición de la vía y afectando a la homeostasis celular tumoral [203]. Oshima y col., demostraron que la expresión del miARN let7 era abundante en exosomas de pacientes con cáncer gástrico metastásico y que este hallazgo estaba asociado a su potencial oncogénico.

La liberación de exosomas por las células tumorales puede interpretarse como una fuente de antígenos tumorales con utilidad para el estudio inmune in vivo así como para el **diseño de vacunas antitumorales**. Los exosomas derivados de células tumorales que contienen antígenos tumorales y moléculas de MHC de clase I pueden transferir estos antígenos tumorales e inducir así una respuesta inmune antitumoral dependiente de células T. Se ha observado también que exosomas secretados a partir de células dendríticas estimuladas con antígenos tumorales muestran una fuerte respuesta antitumoral. Los datos obtenidos en ratón indican que las células dendríticas cargadas con péptidos tumorales estimulan linfocitos T citotóxicos in vivo controlando el crecimiento de tumores establecidos en ratón de una forma T dependiente [204].

Los exosomas tienen implicaciones en más procesos patológicos, como la **progresión tumoral**. Se sabe que el microambiente de muchos tumores está altamente enriquecido por exosomas secretados por células tumorales, pero también por macrófagos y neutrófilos que infiltran el intersticio tumoral. La digestión de la matriz intercelular por proteasas del interior de las vesículas hace

que sus proteínas y moléculas contribuyan a la migración y diseminación tumoral, siendo parte implicada en la formación de metástasis.

Se ha objetivado un papel de los exosomas en la **angiogénesis tumoral**. La digestión de la matriz celular favorece la angiogénesis, proceso por el que la células tumorales reclutan células endoteliales para crear un sistema de suministro de oxígeno y nutrientes suficientes más allá del límite de difusión de éstos [205]. La secreción del factor del crecimiento endotelial (VEGF), entre otros, es el estímulo más potente para la inducción de este proceso. Los exosomas pueden inducir efectos angiogénicos a través de la transferencia de ARNm y microRNA a las células endoteliales y, al ser elementos claves en la coordinación de la vía de crecimiento endotelial, puede estimular los agentes proangiogénicos como el VEGF induciendo de esta manera efectos proangiogénicos, como se ha podido demostrar en glioblastomas en el trabajo publicado por Skog J y col. [206].

Existen evidencias que indican que podrían tener un papel en evadir la **apoptosis celular**. De esta manera los exosomas contribuyen a la resistencia de la terapia antitumoral y promueven la persistencia celular. Los exosomas transportan proteínas antiapoptóticas que contribuyen a evadir la muerte celular. Se ha visto que los exosomas pueden también contribuir al proceso de crecimiento tumoral a través de la vía de apoptosis mediada por Fas [207, 208].

La identificación del papel de los exosomas en el **entorno y microambiente celular** podría ofrecer una perspectiva diferente en lo que se refiere a los tratamientos oncológicos. El encontrar drogas que puedan interferir con la secreción de exosomas por las células tumorales, podría representar una novedosa arma terapéutica que ayudaría a la regresión tumoral. Sin embargo, los estudios realizados en este sentido son anecdóticos. Asimismo, se ha observado que la acumulación de fármacos, como la doxorrubicina y otros agentes quimioterápicos en la membrana de los exosomas podría disminuir sus niveles en el ambiente extracelular y ser un mecanismo novedoso de resistencia farmacológica [209].

Por todo lo expuesto anteriormente se deduce la importancia de los exosomas como protagonistas no muy estudiados hasta la actualidad en las vías de señalización celular que están implicadas en el desarrollo del cáncer.

OBJETIVOS

Los objetivos finales que nos planteamos en este estudio son los siguientes:

1. Seleccionar un subgrupo de pacientes con sospecha de patología pulmonar sometidos a pruebas diagnósticas de las que se pueda extraer una muestra adecuada de LBA y sangre periférica para proceder al estudio.
2. Elaborar una base de datos que recoja las variables clínico-patológicas del grupo de pacientes seleccionados.
3. Determinar la presencia de exosomas en el LBA y en sangre periférica de aquellos pacientes con cáncer de pulmón y con patología pulmonar no tumoral sometidos a fibrobroncoscopia diagnóstica.
4. Utilizar una técnica eficaz y reproducible con la que identificar y aislar exosomas en LBA de pacientes con cáncer de pulmón.
5. Cuantificar y visualizar la presencia de exosomas aislados en LBA y sangre periférica de esta población seleccionada.
6. Describir las características y contenido de los mismos en relación al material genético y proteico que transportan en su interior.
7. Comparar los resultados de este análisis según población oncológica vs no oncológica tratando de determinar la función biológica en la que están implicados dichos exosomas y su papel en las cascadas de señalización y progresión tumoral celular.
8. Correlacionar la cantidad de exosomas aislados y material genetico en los pacientes con cáncer de pulmón en relación con diferentes variables clínico-patológicas de peor pronóstico, así como su relación con la supervivencia global.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS

Este estudio ha sido diseñado y realizado de forma conjunta entre el Hospital Universitario Infanta Leonor de Madrid y el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda de Madrid. Ha sido considerado éticamente correcto por el comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Infanta Leonor, como centro donde se han reclutado los pacientes.

Entre los meses de Enero 2010 y Mayo 2011 se han llevado a cabo 155 procedimientos diagnósticos mediante fibrobroncoscopia (FBC) en el Hospital Universitario Infanta Leonor a pacientes con sospecha de patología pulmonar neoplásica y no neoplásica. Del total de los procedimientos se han seleccionado 30 pacientes diagnosticados de Cáncer de Pulmón no Microcítico y 75 pacientes diagnosticados de patologías pulmonares no tumorales.

7.1. Selección de los pacientes

Todos los pacientes seleccionados eran personas adultas de más de 18 años, con alta sospecha de patología pulmonar para lo cual era necesario realizar una FBC con intención diagnóstica. Presentaban un buen estado general en el momento de la realización de la prueba. Los pacientes seleccionados estaban capacitados para entender el estudio y dar su consentimiento por escrito.

Fueron excluidos del estudio todos aquellos pacientes en los que se realizó la prueba pero presentaban una imposibilidad por alguna condición, de poder participar en el estudio.

7.2. Selección de las muestras

Del total de los 105 pacientes seleccionados se obtuvieron dos tipos de muestras: 3-4 mL de volumen de LBA y 20 cc de sangre periférica en el

momento previo a la fibrobroncoscopia. La extracción de sangre periférica se realizó en condiciones estériles en un tubo de 10 mL con EDTA tras la información y firma del consentimiento informado. La extracción del LBA fue realizada en condiciones estériles, se instiló 100 mL de suero salino fisiológico a temperatura ambiente, en bolos de 20-50 mL del territorio pulmonar del lóbulo medio o lingula, y posterior recolección por medio de la aspiración conectada al broncoscopio en un tubo de 10 mL.

Tras la extracción de las muestras estas se guardaron en nevera a 4°C, codificadas adecuadamente (clave o número asignado al paciente) y fueron trasladados en las siguientes 24 horas, protegidos para evitar su rotura, al laboratorio de biología molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. Asimismo, todas las muestras fueron examinadas por patólogos para el diagnóstico citológico de la muestra del LBA y confirmar la presencia o ausencia de células tumorales que llevaran a un diagnóstico certero de patología oncológica pulmonar.

8. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Se revisaron las historias clínicas de cada uno de los 105 pacientes para determinar su sexo, estado general, fecha de nacimiento, hábito de fumar y tipo de patología pulmonar. En aquellos pacientes diagnosticados de patología pulmonar tumoral se analizaron además las siguientes variables clínico-patológicas:

- Tipo histológico
- Tamaño del tumor
- Localización tumoral
- Afectación ganglionar
- Estadio de la enfermedad
- Invasión vascular
- Grado de diferenciación tumoral
- Tratamiento
- Supervivencia libre de enfermedad
- Supervivencia libre de progresión
- Supervivencia global

Un esquema de clasificación del estadio del tumor que sea de utilidad desde el punto de vista clínico debe incluir las características del tumor que definen su conducta. En este estudio el estadio fue elaborado según el sistema TNM propuesto por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). El objetivo del sistema TNM, es un esquema de clasificación sencillo, que puede incorporarse en un formulario para llevar a cabo el diagnóstico de extensión y aplicarse de forma universal. Esta clasificación es idéntica a la de la *International Union Against Cancer* (UICC). La clasificación del AJCC parte de la premisa de que los tumores del mismo lugar anatómico y análoga histología comparten patrones similares de crecimiento y evolución. Este sistema está basado en que a medida que el cáncer aumenta de tamaño (T), la afectación de los ganglios linfáticos (N) y/o las metástasis a distancia (M) son más frecuentes.

Estos tres episodios significativos en la historia natural de un cáncer -el crecimiento local del tumor, la diseminación de los ganglios linfáticos regionales y las metástasis- se utilizan según aparezcan o no en la exploración clínica, antes de comenzar el tratamiento definitivo, para indicar la extensión anatómica del mismo. Este método abreviado de indicar la extensión de la enfermedad en un momento determinado constituye la expresión del diagnóstico de extensión del cáncer en ese período de su progresión.

Es un sistema que va destinado a proporcionar un medio para comunicar esta información con facilidad a otros, para ayudar a las decisiones terapéuticas y para valorar el pronóstico. Por último, aporta un mecanismo para comparar grupos similares de pacientes al valorar tratamientos potencialmente diferentes.

Tumor primario (T)				
TX	No se puede evaluar el tumor primario o se demuestra el tumor por la identificación de células malignas en el esputo o en el lavado bronquial pero no se visualiza en las imágenes de la broncoscopia			
T0	No hay ningún indicio de tumor primario			
Tis	Carcinoma in situ			
T1	Tumor ≤ 3 cm en su dimensión máxima, rodeado por pleura pulmonar o visceral, sin indicios broncoscópicos de invasión más proximal que el bronquio lobular (no en el bronquio primario)			
T1a	Tumor ≤ 2 cm en su dimensión máxima			
T1b	Tumor ≥ 2 cm pero ≤ 3 cm en la dimensión máxima			
T2	Tumor ≥ 3 cm pero ≤ 7 cm o tumor con cualquiera de lo siguiente: <ul style="list-style-type: none">• Invasión de pleura visceral• Afectación del bronquio principal ≥ 2 cm distal a la carina• Se relaciona con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no afecta a todo el pulmón			
T2a	Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm en la dimensión máxima			
T2b	Tumor >5 cm pero ≤ 7 cm en la dimensión máxima			
T3	Tumor > 7 cm o que invade cualquiera de los siguiente: <ul style="list-style-type: none">• Pared torácica (incluidos los tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica o pericardio parietal, pleura parietal• Tumor en el bronquio primario< 2 cm distal a la carina pero sin afectación de la carina• Atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón o nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en el mismo lóbulo			
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral o carina; o nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en el lóbulo ipsilateral			
Ganglios linfáticos regionales (N)				
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales			
N0	No hay metástasis a ganglios regionales			
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales o hiliaresipsolaterales y ganglios intrapulmonares, incluida la afectación por extensión directa			
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos o subcarínicosipsolaterales			
N3	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales hiliares contralaterales, escalenos ipsolaterales o contralaterales o supraclaviculares			
Metástasis a distancia (M)				
M0	No hay metástasis a distancia			
M1	Metástasis a distancia			
M1a	Ganglio(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural maligno (o pericárdico)			
M1b	Metástasis a distancia			
Estadios de los subgrupos TNM				
Estadio 0	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Tis NO MO	IA T1 NO MO	IIA T1 N1 MO	IIIA T1 N2 MO T2 N2 MO T3 N1 MO T3 N2 MO	TxNx M1
	IB T2 N1 MO	IIB T2 N1 MO T3 N0 MO	IIIB Tx N3 MO T4Nx MO	

Tabla 6: Clasificación TNM (7ª edición, 2009) según el American Joint Committee on Cancer (AJCC)

El grado de diferenciación del tumor es una valoración cuantitativa de la diferenciación del tumor, que se expresa como el grado del parecido de éste con el tejido normal en ese lugar. Fue determinado de acuerdo con el porcentaje de presencia glandular en las células del tumor, distinguiéndose en tumores bien, moderadamente y pobremente diferenciados.

El tipo histológico es una valoración cualitativa para atribuir una categoría (tipo) a un tumor, según el tipo tisular o celular normal al que más se parezca. En general, la clasificación histológica se basa en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada en numerosas ocasiones para las localizaciones anatómicas específicas, como el pulmón, que es el caso que nos ocupa. En nuestra serie, del total de muestras seleccionadas de patología tumoral, histológicamente un 54% correspondía a carcinomas escamosos o epidermoides y un 46% eran adenocarcinomas. En cuanto a las muestras seleccionadas de aquellos pacientes con neumopatías, la mayoría, un 32% presentaba patología intersticial, un 24% patología infecciosa pulmonar, el 18% nódulo pulmonar solitario, un 15% se estudiaban por episodio de hemoptisis y hasta un 11% otro tipo de enfermedad pulmonar.

Los datos se almacenaron en la hoja de cálculo "Excel" (Microsoft Corporation EEUU; Versión Windows XP) y se analizaron con el programa estadístico "SPSS" (*Statistical Package for Social Sciences*, SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EEUU; Versión 12.0).

Cod	Edad	Tipo histología	Fuma	Sexo	Tamaño	Ganglios	Invasión	Grado	Estadio	PS	Estado actual
1	73	Epidermoide	Sí	Hombre	4,3	4	No	Moderado	IV	1	Exitus
2	73	Epidermoide	Sí	Hombre	2,5	2	No	Poco	IV	0	Exitus
3	83	Adenocarcinoma	No	Mujer	4	3	No	Moderado	IV	3	Vivo
4	79	Epidermoide	Sí	Hombre	8,8	2	No	Moderado	3B	1	Exitus
5	47	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	2	3	No	Moderado	3A	1	Vivo
6	51	Desconocido	Sí	Mujer	4	0	No	Bien	IV	2	Exitus
7	68	No microcitico	No	Mujer	4	2	No	Moderado	IV	1	Exitus
8	66	Epidermoide	Sí	Hombre	3,7	1	No	Bien	IA	0	Vivo
9	76	Adenocarcinoma	No	Mujer	4,4	0	No	Bien	IB	0	Vivo
10	74	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	3	0	No	Moderado	IV	1	Exitus
11	74	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	7	2	Sí	Moderado	2B	0	Exitus
12	80	No Microcitico	Sí	Hombre	3,7	1	Sí	Poco	3B	1	Exitus
13	84	Epidermoide	Sí	Hombre	2	0	No	Moderado	2A	3	Vivo
14	71	No microcitico	No	Mujer	2	0	Sí	Bien	IV	2	Exitus
15	72	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	7,9	5	Sí	Moderado	IV	1	Exitus
16	49	Adenocarcinoma	Sí	Mujer	4	0	Sí	Moderado	IV	1	Exitus
17	68	Adenocarcinoma	Sí	Mujer	2,8	2	Sí	Bien	IV	2	Exitus
18	61	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	3,4	3	No	Moderado	IV	1	Exitus
19	62	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	5	2	Sí	Moderado	IV	1	Exitus
20	69	Epidermoide	Sí	Hombre	12	3	Sí	Bien	IV	1	Exitus
21	58	Epidermoide	Sí	Hombre	4,5	0	Sí	Moderado	3A	1	Exitus
22	82	Epidermoide	Sí	Hombre	2,9	0	Sí	Bien	IV	2	Exitus
23	76	Epidermoide	Sí	Hombre	2,7	0	Sí	Bien	IA	2	Vivo
24	63	No microcitico	Sí	Hombre	8	0	Sí	Moderado	IV	2	Exitus
25	66	Epidermoide	Sí	Hombre	7	0	Sí	Moderado	2A	1	Exitus
26	77	No microcitico	Sí	Hombre	2,8	1	Sí	Moderado	IV	1	Exitus
27	65	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	5	0	Sí	Moderado	IB	0	Vivo
28	68	Adenocarcinoma	Sí	Hombre	2,2	1	Sí	Moderado	3A	1	Vivo
29	82	Epidermoide	Sí	Hombre	2,8	0	Sí	Bien	IB	2	Vivo
30	77	Epidermoide	SI	Hombre	1,3	0	Sí	Bien	3A	1	Vivo

Tabla 7: Características clínico-patológicas de los pacientes diagnosticados de CP

La mediana de edad fue de 62 años en la muestra recogida y como puede verse en la tabla, un 39% corresponde a población femenina y un 61% masculina. Del total de la población un 69% eran fumadores y un 31% no fumadores.

9. SEGUIMIENTO CLÍNICO Y TRATAMIENTO

El estudio no marcaba ninguna condición en cuanto a la hora de indicar el tratamiento y seguimiento de los pacientes incluidos en el mismo. Los pacientes seleccionados fueron sometidos a una anamnesis básica y exploración física completa, informando a cada paciente del objetivo del estudio y obteniendo el consentimiento informado previo al procedimiento diagnóstico.

Todos aquellos pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón fueron discutidos en el comité de tumores del Hospital Universitario Infanta Leonor con el objeto de recibir el manejo terapéutico adecuado desde el punto de vista oncológico. Todos los pacientes diagnosticados en estadios iniciales fueron sometidos a cirugía siendo este el único tratamiento curativo del cáncer de pulmón. Dado que la mayoría de los pacientes sufren recidivas y acaban falleciendo a consecuencia de la enfermedad, la mayoría de los pacientes de nuestra serie, fueron tratados con quimioterapia (QT). Todos los pacientes con estadios localmente avanzados fueron tratados con la combinación de QT y radioterapia (RT) según el protocolo del Hospital Universitario Infanta Leonor. Cuando existió enfermedad metastásica los pacientes fueron tratados generalmente con QT de combinación en forma de dobletes; en el caso de adenocarcinomas; Pemetrexed/CDDP, en el caso de carcinoma epidermoide CDDP/Gemcitabina o CDDP/Paclitaxel. Aquellos pacientes con enfermedad avanzada y mal estado general fueron tratados con monoterapia.

El seguimiento de los pacientes se realizó en el Hospital Universitario Infanta Leonor con anamnesis básica y por aparatos, exploración física, analítica completa, TAC tóraco-abdominal, cada 3 meses durante el primer año, cada 4 meses durante el segundo y tercer año. En caso de detectarse una recaída a cualquier nivel el programa de revisiones se interrumpió, reiniciando tratamiento oncológico.

Todos los pacientes con diagnóstico de patología pulmonar no oncológica fueron remitidos al servicio de Neumología del Hospital Universitario Infanta Leonor para realizar el tratamiento específico en función del tipo de patología diagnosticada y con el seguimiento adecuado para ello.

9.1. Aislamiento de exosomas a partir del plasma y del lba de pacientes

Todos los plasmas procedentes de las muestras de sangre (20cc) se obtuvieron mediante una primera centrifugación a 500xg durante 25 minutos a 4°C. Se realizaron alícuotas del plasma y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Los exosomas se aislaron a partir de las muestras de plasma de los pacientes mediante un procedimiento de centrifugaciones diferenciales ya publicado previamente, testado y eficaz para este propósito y que a continuación se describe.

9.1.1. Aislamiento de exosomas a partir del plasma de los pacientes

Se partió de un volumen de muestra de 3 mL de plasma de pacientes con CP y de los diagnosticados de patologías no tumorales. Con dicho plasma se realizó una centrifugación a 1700xg durante 20 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. Una vez recuperado el sobrenadante, se sometió a un proceso de filtración mediante filtros de PVDF (del inglés *PolyVinylidene Fluoride*) de 0.22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) para eliminar las partículas mayores de 220 nm.

El filtrado se ultracentrifugó (Optima™ MX-XP BeckmnCoulter, Fullerton, CA) a 120.000xg durante 90 minutos a 4°C para obtener los exosomas.

Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 mL de solución amortiguadora PBS (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*) y se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

9.1.2. Aislamiento de exosomas a partir del LBA de los pacientes

A partir de un volumen de 4 mL de LBA se realizó una centrifugación a 500xg durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a 17.000xg durante 20 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante recuperado se ultracentrifugó (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 120.000xg durante 90 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 mL de PBS.

Una vez recuperados los exosomas, dicho volumen se sometió a filtración mediante filtros de PVDF de 0.22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Ireland). Finalmente, los exosomas resuspendidos en PBS se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

9.2. Cuantificación de los exosomas aislados del plasma y del LBA

9.2.1. Método de la Actividad Acetilcolinesterasa (AChE)

Principalmente, existen dos enzimas con actividad colinesterasa, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE). Esta clasificación está basada en la localización tisular de la enzima, la especificidad de sustrato, y en la susceptibilidad a inhibición por diferentes sustancias.

Los procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de colinesterasa son muy diversos, pero los más empleados son los colorimétricos, que se basan en la detección de la tasa de desaparición del sustrato de la enzima o de aparición del producto de la reacción.

La técnica espectrofotométrica más utilizada es el método de Ellman (*Ho and Ellman, 1969*), basada en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATCh) por la enzima colinesterasa. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 405 y 420 nm de longitud de onda, con un óptimo en 412 nm. La tasa de aparición del producto de la reacción es mayor conforme aumenta la actividad enzimática existente en la muestra.

Para cuantificar de manera relativa los exosomas del plasma y del LBA se utilizó el método de la Acetilcolinesterasa, el cual es un procedimiento usado previamente que fue descrito por Savina y col., 2002. Un volumen de 40 μ L de cada una de las fracciones de exosomas aislados previamente, se incubaron con 260 μ L de una solución compuesta por 1.25 mM de acetiltiocolina y 0.1 mM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Sigma-Aldrich, Mo) en PBS (volumen final de 300 μ L). Dicha incubación se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos a una temperatura de 37°C, produciéndose un cambio en la absorbancia medida por un lector de microplacas a 30 minutos a 412 nm (Multiskan Ex; Thermo Scientific).

9.2.2. NanoSight

El NanoSight (LM10 *nanoparticle characterization system*) es un equipo que mide el tamaño y la carga de las partículas según el movimiento browniano que realizan en función de los cambios en la temperatura y en la viscosidad del medio. Con dicho equipo se analizó la concentración de los exosomas en los diferentes grupos estudiados (NTpl, NTbal, Tpl y Tbal) por triplicado; los exosomas se resuspendieron en PBS 1X.

9.3. Identificación de los exosomas aislados del plasma y del LBA

9.3.1. Visualización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión

Cuando observamos muestras al microscopio electrónico éstas han de tener un grosor adecuado para que los electrones puedan atravesarlas y formar una imagen. El grosor con el que normalmente se trabaja está entre 50 y 90 nm, que es muy inferior al de las secciones de microscopía óptica. Ello requiere un procesamiento especial de la muestra. Las muestras biológicas primeramente se fijan. La fijación consiste en preservar las características estructurales y bioquímicas de las muestras. En microscopía electrónica se utilizan fijadores de tipo aldehído (paraformaldehído y glutaraldehído), ya que son los que dan una mejor conservación ultraestructural. Normalmente se combina aldehídos con tetróxido de osmio como agente fijador.

Una vez fijada, la muestra se incluye en algún material que proporcione suficiente consistencia para poder obtenerse las secciones tan finas mencionadas. Los materiales más utilizados son las resinas de tipo epoxi y de baja viscosidad. Muchas de estas resinas presentan como característica que no son miscibles con el agua, por lo cual la muestra biológica debe experimentar una deshidratación para sustituir el agua por un disolvente orgánico que sí sea miscible con la resina. Los disolventes más utilizados son el etanol y la acetona. Por último, la muestra puede continuar el proceso de inclusión en una resina en estado líquido que polimerizará a temperaturas de 60°C hasta obtenerse un bloque de la dureza y consistencia necesaria.

Los exosomas aislados del plasma y del LBA resuspendidos en 200 µL de PBS se fijaron en paraformaldehído al 2% a una concentración final de 200 mM en PBS (pH 7.4). Los exosomas fijados se colocaron en una delgada película plástica de aproximadamente 200 Å de espesor (película de formvar), que a su vez se incluyó sobre una grilla metálica que es una rejilla circular de 3 mm de diámetro que contiene numerosas aperturas (mesh). Dicha película se reforzó depositando

sobre la misma una fina capa de carbono evaporada al vacío. A continuación, las muestras se dejaron secar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, los exosomas se fijaron en glutaraldehído al 1% durante 5 minutos, se realizó otro lavado y se tiñeron con una disolución de oxalato de uranilo durante otros 5 minutos.

Debido a que los materiales biológicos son en general muy “transparentes” a los electrones y no ofrecen resistencia al paso de los mismos, es necesario utilizar técnicas de contraste. Con este fin, las muestras fueron embebidas en acetato de uranilo al 0,4% siendo una sal de un metal pesado, y metilcelulosa al 1,8%. Dicho proceso se incubó en hielo durante 10 minutos. Cuando los electrones encuentran en su trayectoria metales pesados, no los pueden atravesar, dando en la pantalla del microscopio electrónico una imagen configurada por un densitograma.

Las zonas más oscuras indican menor cantidad de impactos de electrones (son los que no pudieron atravesar el obstáculo debido a los metales pesados) y las sombras que resultan muestran con claridad el contorno de los materiales biológicos contrastados. Finalmente, el portaespecimen se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La observación e identificación de las muestras se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 1010 JEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), 100 kV) entre 80.000 y 120.000 aumentos.

9.3.2. Unión de los exosomas a microesferas conjugadas con el anticuerpo específico de exosomas CD63. Visualización mediante Microscopía Confocal

El gran avance de la microscopía confocal se basa en poder eliminar la señal proveniente de la zona fuera de plano de foco en la muestra, de esta forma se obtiene una imagen de mayor resolución espacial. Se obtiene un aumento

notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia. Asimismo, permite realizar reconstrucciones tridimensionales más precisas, de mejor calidad, de mayor resolución y en menos tiempo que con otros métodos.

Para el análisis de exosomas mediante microscopía confocal, debido a su reducido tamaño (50-100 nm), es aconsejable la unión de los mismos a microesferas de poliestireno de mayor tamaño (7.5 μm) que facilitan su análisis mediante dicha técnica.

En la superficie de las microesferas se conjugó covalentemente el anticuerpo específico de exosomas CD63 (Abcam, Cambridge, UK) al cual se unieron posteriormente los exosomas aislados. El uso de dichas microesferas (BDTM CBA Functional Beads, Becton Dickinson, NJ) requirió de un acondicionamiento previo tanto de las microesferas como del anticuerpo a conjugar.

El pretratamiento de las microesferas incluyó: sonicación (Branson 1510-DTH, Branson, Danbury, CT, USA), incubación con DTT (del inglés, *1,4-dithiothreitol*) y resuspensión en buffer de acoplamiento. El pretratamiento del anticuerpo CD63 antes de la conjugación necesitó de una incubación durante 1 hora con solución sulfo-SMCC (del inglés, *Sulfosuccinimidyl 4-[maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate*). Se conjugó el anticuerpo CD63 a las microesferas funcionales durante 1 hora tras la cual se procedió a un tratamiento e incubación con NEM a 2 mg/mL (del inglés, *N-Ethylmaleimide*). Finalmente, las microesferas conjugadas fueron resuspendidas en buffer de almacenamiento (6×10^6 microesferas/mL aproximadamente) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Se realizó la unión específica de los exosomas a las microesferas incubando durante toda la noche y en agitación 250 μL de exosomas con 25 μL ($N=1.5 \times 10^5$) de microesferas conjugadas con CD63. Se ejecutaron dos lavados

(centrifugación a 900xg durante 3 minutos y eliminación del sobrenadante) con PBS, tras los cuales se incubó el complejo microesferas-exosomas con PBS-1% de FBS durante 20 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados con PBS y se resuspendieron en 200 µL de PBS.

En cuanto al marcaje de los exosomas, se incubaron los 200 µL de las microesferas conjugadas unidas a los exosomas con 10 µL del anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno epitelial humano Ber-EP4 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*) durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Dicho anticuerpo monoclonal es específico para dos antígenos constituidos por glicopolipéptidos de membrana (34 y 39 kDa), los cuales están expresados en la mayoría de tejidos epiteliales humanos normales y neoplásicos. Un anticuerpo irrelevante de ratón contra IgG1 conjugado con FITC se usó como control isotópico de la tinción. Se efectuaron dos lavados con PBS y se resuspendieron en 300 µL de PBS.

Gracias a la técnica de microscopía confocal (Leica TCS SP5) se ha podido visualizar la unión de los exosomas a la microesfera de poliestireno de mayor tamaño. Estas imágenes fueron capturadas a una velocidad de 400 Hz y con una resolución espacial de 1.024 x 1.024 pixel. Posteriormente, estas imágenes fueron tratadas mediante la aplicación informática Leica Application Suite 2.02.

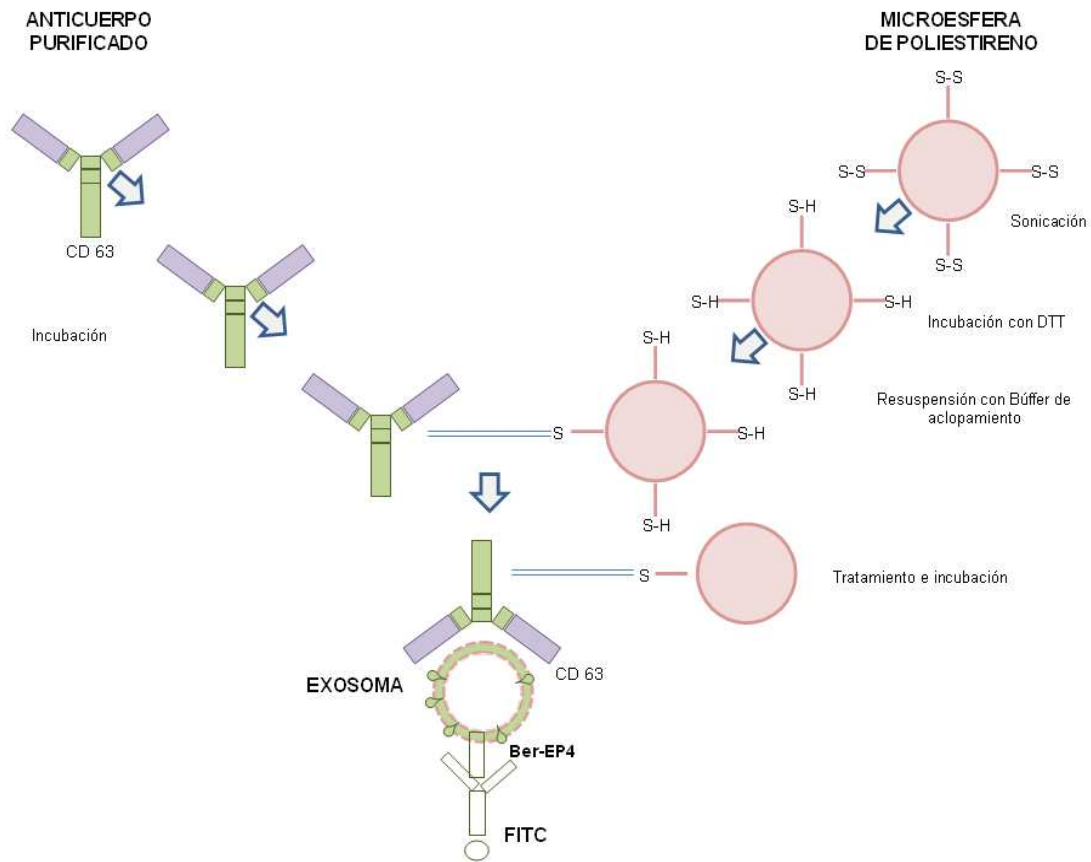


Figura 17: Unión del anticuerpo a la microesfera de poliestireno y posterior ensamblaje del exosoma a dicho complejo. Marcaje del exosoma con el anticuerpo anti-Ber-EP4-FITC.

9.4. Extracción de proteínas y análisis por inmuno-transferencia

La inmunotransferencia es un método utilizado para la detección y cuantificación de proteínas en una muestra biológica. Consiste en la electroforesis de proteínas desnaturalizadas en un gel para separarlas por su masa molecular. Las proteínas son transferidas posteriormente desde el gel hacia una membrana donde son visualizadas mediante el uso de anticuerpos específicos para las proteínas de interés.

La electroforesis es la técnica utilizada para la separación de proteínas basada en el desplazamiento de proteínas cargadas en un campo eléctrico. Es muy útil como método analítico y su ventaja es que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite hacer una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla o del grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida actúa como tamiz molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas de forma proporcional al cociente carga/masa. La electroforesis en presencia de SDS (del inglés *sodium dodecyl sulfate*) separa las proteínas casi exclusivamente en función del peso molecular. EL SDS se une a la mayoría de las proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. El SDS ligado incorpora una gran carga negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa similar.

Los geles se transfieren eléctricamente a membranas que pueden ser de distinta naturaleza (nitrocelulosa o PVC). La preparación de la transferencia implica el montaje de un sándwich con el gel cuyas bandas se van a transferir a la membrana. Después, se aplica un campo eléctrico horizontal que hace despegarse del gel a las proteínas previamente separadas, las cuales se adhieren a la membrana.

Una vez finalizada la transferencia se puede desarrollar un marcaje con anticuerpos específicos permitiendo la detección de un componente proteico concreto en una muestra.

En nuestro estudio, la extracción de proteínas y el análisis por inmunotransferencia se realizaron de acuerdo a lo descrito en la literatura en procedimientos previos.

Los exosomas se lisaron con el tampón de lisis RIPA (de “Radio-Immunoprecipitation Assay”; Sigma Aldrich) compuesto por 50mM de Tris-HCL a pH 8.0, 150mM de NaCl, 1.0% de Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% de deoxicolato sódico y 0.1% de dodecilsulfato sódico y un cóctel de inhibidores de proteasas (Halt™ Proteasa & Phosphatase Single Use Inhibitor Cocktail kit, Thermo Scientific). Los extractos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 20 minutos para eliminar el resto de componentes no proteicos. La concentración de proteínas se determinó mediante el espectofotómetro Nanodrop.

Una concentración de 20 microgramos de proteína total se desnaturizó mediante un tampón 2X de SDS a 95°C, y se separaron a continuación por peso molecular mediante electroforesis en gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 10%. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema iBlot® Western Blotting System y los reactivos del kit iBlot®Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Invitrogen-Life Technologies).

Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4° C. Después se realizaron tres lavados con PBS-0.1% Tween20 y se incubaron durante una hora con el correspondiente anticuerpo secundario a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS-0.1% Tween20. Todos estos pasos se realizaron en agitación. Las diluciones de todos los anticuerpos se realizaron en solución de bloqueo con Tween20 al 0.01%.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anticuerpos monoclonales de conejo para Flotilina 1 y CD9 (ab40753, ab92726 respectivamente, en una

dilución 1:500; Abcam, Cambridge, UK), anticuerpo monoclonal de ratón contra CD63 (ab59479 en una dilución 1:500; Abcam, Cambridge, UK), y anticuerpos de conejo policlonales contra Calnexina (sc-9158 y sc-11397, respectivamente, en una dilución 1:200; Santa Cruz Biotechnology).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón con marcaje en infrarrojos a 680 y 800 en una dilución 1:10000 (LI-COR Biosciences) para la detección en la misma membrana de las proteínas de interés.

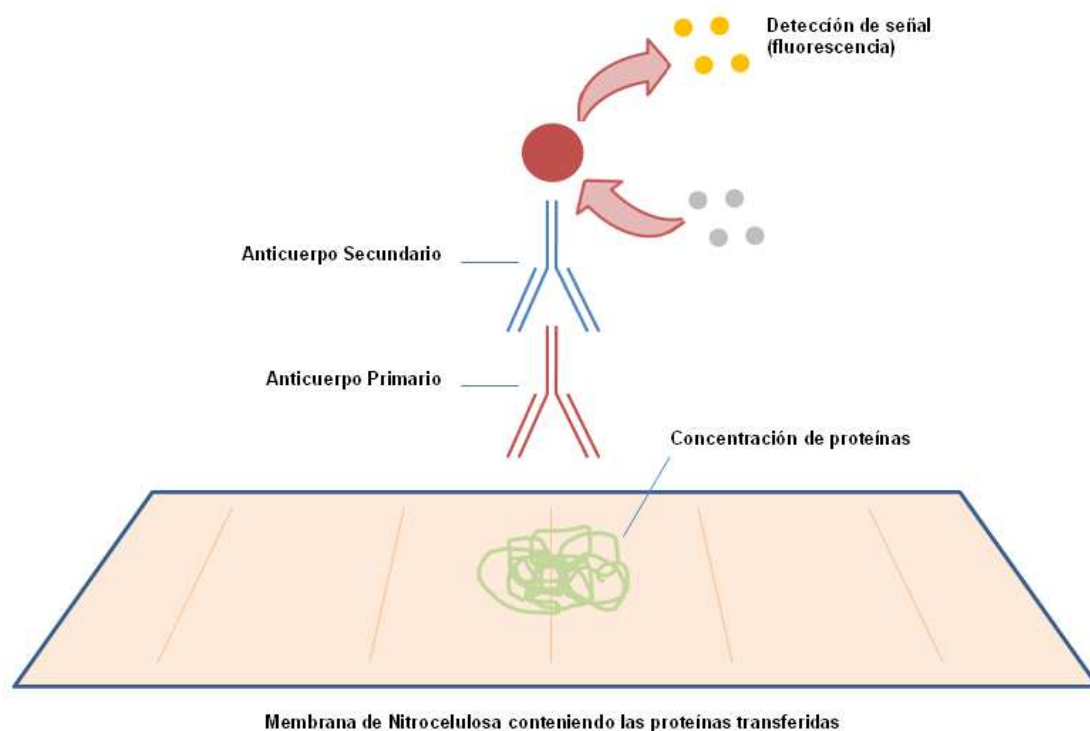


Figura 18: Imagen resumen del proceso de Western-Blott

Posteriormente las proteínas fueron detectadas, analizadas y cuantificadas mediante densitometría de banda, usando el sistema de imagen Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Cambridge, UK).

9.5. Extracción de miARN

La extracción del ARN total de los exosomas aislados se llevó a cabo mediante el *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit y se completó con un procedimiento específico para enriquecer el extracto en miARN (Ambion Inc., TX), de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante. El proceso de extracción de miARN de los exosomas utiliza una extracción orgánica seguida de una inmovilización de los miARN en filtros de fibra de vidrio.

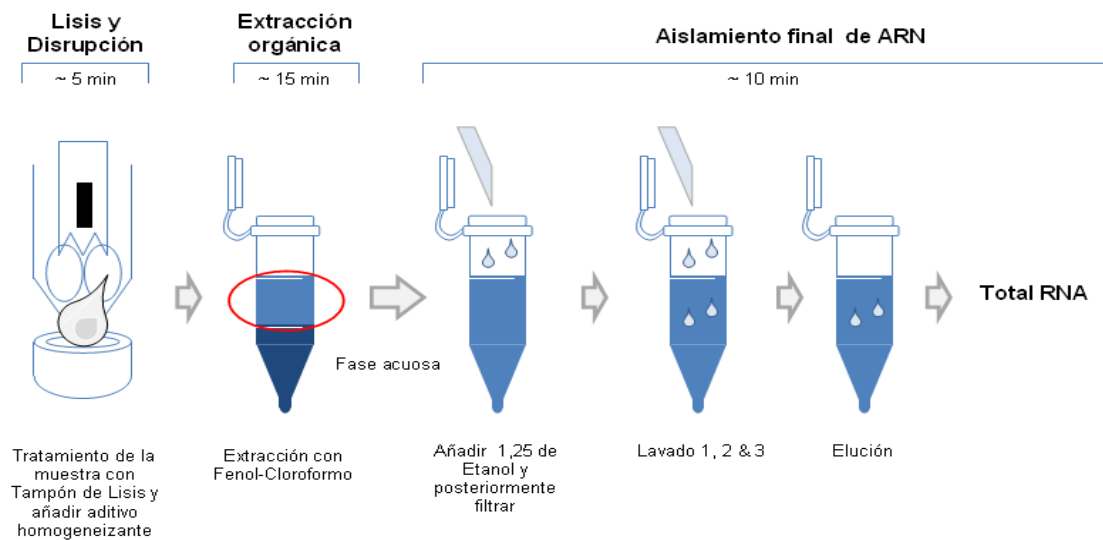


Figura 19. Resumen del proceso de aislamiento de miARN mediante el *mirVana* miRNA isolation Kit

Como se muestra en la figura, el primer paso fue someter a la muestra (exosomas aislado de LBA o de plasma) a un tratamiento con tampón de lisis. Posteriormente la muestra se somete a una extracción con Fenol-Cloroformo que permite separar la solución en dos fases, acuosa y orgánica. La fase acuosa, donde se localizan los miARN, se somete a diferentes etapas de filtrado (retención de miARNs en la membrana) y lavado con porcentajes crecientes de etanol absoluto y tampones de limpieza incluidos en el kit de extracción, para su elución final en agua libre de ARNasas precalentada a 95°C.

9.6. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción de los miARN aislados de los exosomas que posteriormente se iban a usar en el miARN PCR Array, se utilizó el miScript II RT Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante. Con este procedimiento se consiguió una eficiente retrotranscripción de los miARN generándose un ADN complementario (ADNc) que podía ser usado para la posterior detección de múltiples miARN. Para la retrotranscripción de los miARN aislados de los exosomas de los individuos que constituían la serie externa de validación, se utilizó el TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante.

El proceso de transcripción reversa es el proceso de síntesis de una hebra de ADNc a partir de una secuencia de ARN específico. La reacción la lleva a cabo una polimerasa especial, denominada transcriptasa inversa, capaz de trabajar con cadenas de ribonucleótidos. El ARN extraído y enriquecido en miARN se utilizó para las reacciones de retrotranscripción. En el caso de los miARN, al no estar inicialmente poliadenilados, los protocolos específicos usados para su conversión en ADNc contienen una polimerasa adicional que se encarga de añadirles la cola poli(A) necesaria para la retrotranscripción. Adicionalmente, el proceso de generación de ADNc requiere Oligo-dT, un ADN sintético compuesto por nucleótidos con base timina utilizado como cebador universal para la reacción de retrotranscripción. Los ADNc generados se cuantificaron usando el aparato NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y sus concentraciones fueron igualadas a 100 µg/µL para normalizar los resultados de los subsecuentes análisis.

9.7. Análisis de los perfiles de expresión de los miARN en las muestras agrupadas. Cuantificación a tiempo real en la serie de validación

Como ya se ha comentado previamente, a partir de los exosomas aislados del LBA y del plasma de pacientes con patologías pulmonares tumorales y no tumorales, se generaron cuatro muestras, cada una de ellas mezclando 15 casos de cada respectivo tipo (LBA de paciente tumoral, plasma de paciente tumoral, LBA de paciente no tumoral y plasma de paciente no tumoral). En cada una de estas cuatro muestras se realizó el análisis de los perfiles de expresión de los miARN y los resultados obtenidos fueron validados posteriormente en una serie independiente de pacientes.

El objetivo de la PCR (de inglés, *Polimerase Chain Reaction*) es obtener una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA específico. Fue descrita por Kary B. Mullis en 1985 y su desarrollo le valió el galardón del premio Nobel de Química en 1993. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra existente. Su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más sencillo realizar análisis de cuantificación sobre el material genético amplificado.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

Una reacción de PCR presenta tres fases: una primera en la que los productos de PCR son indetectables, ya que la señal que pudieran emitir está por debajo del umbral de detección de los sistemas utilizados (1); una segunda fase de crecimiento exponencial, o fase logarítmica donde la eficiencia de amplificación

es constante, que abarca desde el momento en que se detectan los productos de PCR hasta que la eficiencia de la polimerasa decae y la reacción se satura (2), momento en el que se entra en la última de las fases, la denominada fase de meseta (3).

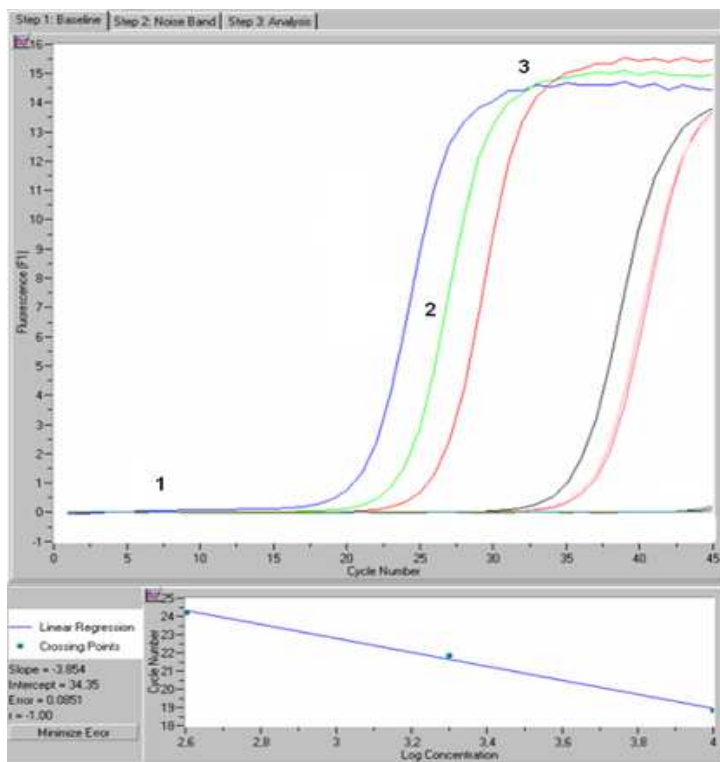


Figura 20: Fases que componen una reacción de PCR. 1, fase de crecimiento no detectable; 2, fase de crecimiento exponencial; 3, fase de saturación

Con las técnicas clásicas de PCR, la cuantificación se realizaba en la fase de meseta, cuando la reacción se podía haber saturado debido a la caída de actividad de la polimerasa, al agotamiento de alguno de los reactivos, o a que los propios productos de PCR compiten en cada ciclo de PCR. En cualquier caso, la cuantificación podía no ser exacta ya que el producto final que se detectaba no solo dependía de la cantidad de muestra en la reacción. Sin embargo, la cuantificación a tiempo real o RT-PCR (del inglés *Real-Time PCR*) está basada en una reacción de PCR en la que en cada uno de los ciclos de amplificación se incorpora un fluoróforo a las nuevas cadenas de ADN sintetizadas, con lo que

en cada uno de esos ciclos podemos cuantificar el aumento en fluorescencia y, a través de una serie de equivalencias, la cantidad de ADN de partida.

Para el marcaje del ADN hemos optado por el SYBER Green I, un marcador de ADN de doble hebra que se une específicamente al surco estrecho (hendidura secundaria) de la doble hélice de ADN, unión que amplifica en 100 veces su fluorescencia. En el caso de la cuantificación a tiempo real la medición se realiza en la fase de crecimiento exponencial, fase casi constante donde el curso de la amplificación queda definido por la ecuación: $T_n = T_0 (E)^n$, donde T_n es la cantidad, en el ciclo n , del gen problema que se quiere cuantificar; T_0 es la cantidad inicial de ese gen y E es la eficiencia de la amplificación, la cual varía entre 2, cuando cada copia del producto de PCR es amplificada una vez por ciclo de PCR, hasta 1 donde no existe amplificación de ninguna de las copias. Como es lógico, cuanto más cantidad de nuestro gen problema tengamos inicialmente antes se entrará en la fase de crecimiento exponencial.

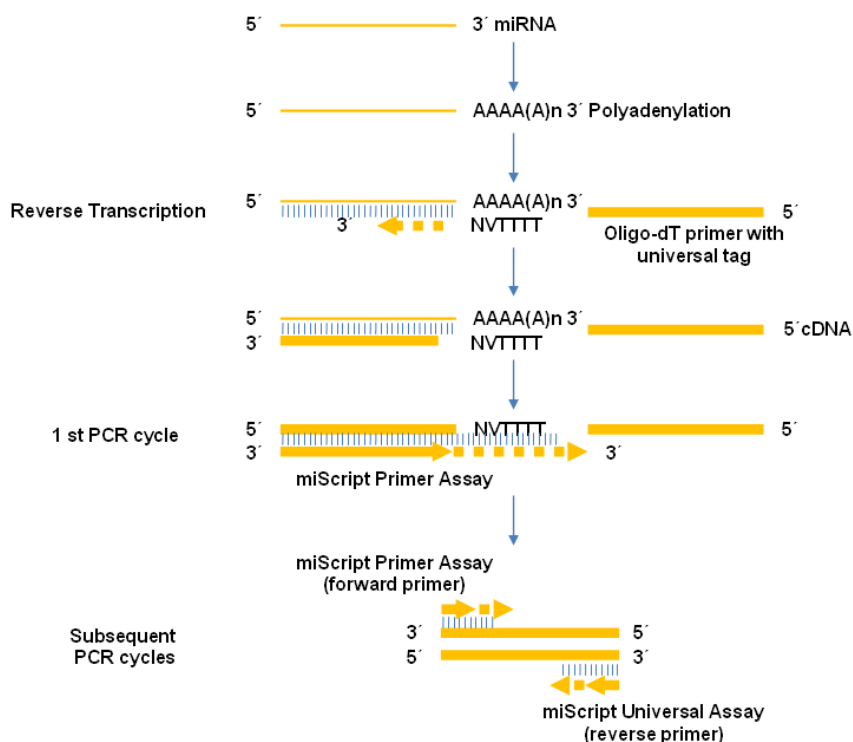


Figura 21. Esquema representativo de la técnica PCR-array cuantitativa a tiempo real.

Con los datos obtenidos en las diferentes cuantificaciones a tiempo real de las muestras agrupadas, se realizaron diferentes cuantificaciones relativas comparando entre sí los cuatro tipos de muestras. Los diferentes coeficientes de comparación se calcularon utilizando la fórmula matemática $2^{-\Delta Ct}$, donde:

Ct = ciclo de PCR en el cual se detecta expresión del miRNA

ΔCt = Ct miRNA diana - Ct miRNA control

En cada una de las cuatro muestras generadas mezclando 15 casos de cada respectivo tipo de muestra (LBA de paciente tumoral, plasma de paciente tumoral, LBA de paciente no tumoral y plasma de paciente no tumoral) se realizó el análisis de los perfiles de expresión de los miARN utilizando el miScript SYBR® Green PCR Kit usado con “miScript miRNA PCR array (human miFinder)” (Qiagen, Valencia, CA), de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante. Este sistema permite la detección específica y la cuantificación de los niveles de 84 secuencias de miARN simultáneamente, usando técnicas de cuantificación a tiempo real (Light Cycler 480; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

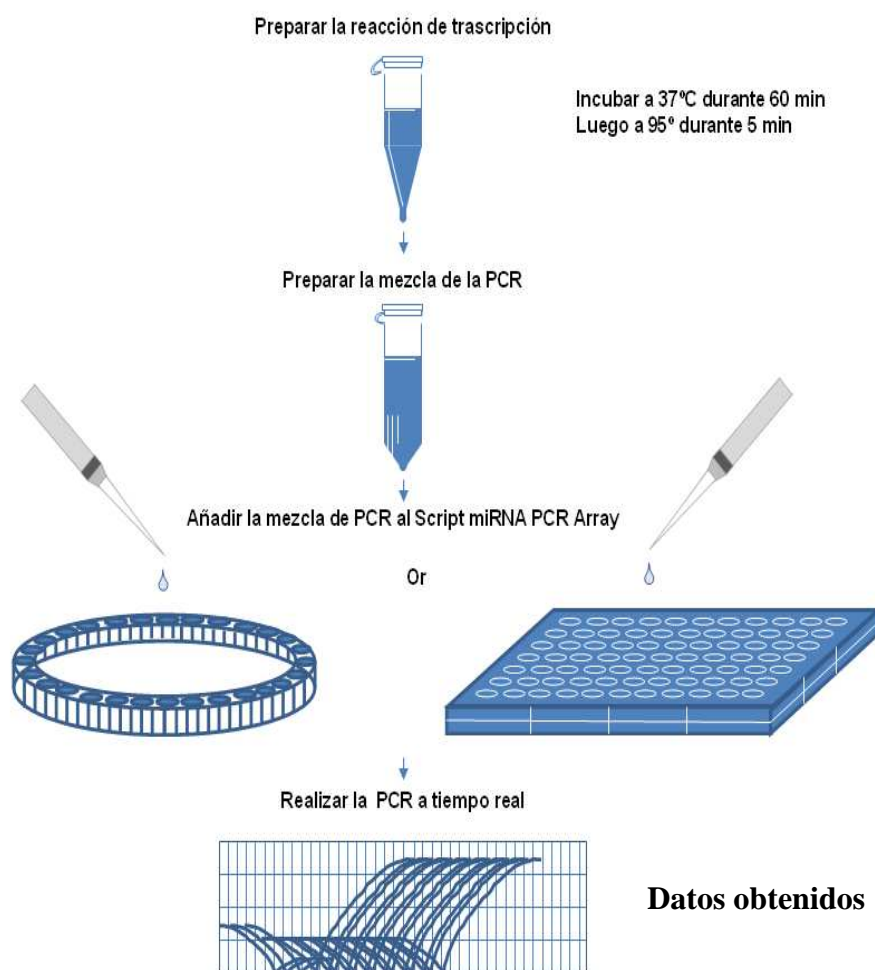


Figura 22: Resumen del procedimiento de miScript miRNA SYBR® Green PCR array Kit

Posición	Maduro ID	Posición	Maduro ID	Posición	Maduro ID
A01	hsa-miR-142-5p	C09	hsa-miR-125b-5p	F05	hsa-let-7b-5p
A02	hsa-miR-9-5p	C10	hsa-miR-99a-5p	F06	hsa-miR-19b-3p
A03	hsa-miR-150-5p	C11	hsa-miR-28-5p	F07	hsa-miR-17-5p
A04	hsa-miR-27b-3p	C12	hsa-miR-320a	F08	hsa-miR-93-5p
A05	hsa-miR-101-3p	D01	hsa-miR-125a-5p	F09	hsa-miR-186-5p
A06	hsa-let-7d-5p	D02	hsa-miR-29b-3p	F10	hsa-miR-196b-5p
A07	hsa-miR-103a-3p	D03	hsa-miR-29a-3p	F11	hsa-miR-27a-3p
A08	hsa-miR-16-5p	D04	hsa-miR-141-3p	F12	hsa-miR-22-3p
A09	hsa-miR-26a-5p	D05	hsa-miR-19a-3p	G01	hsa-miR-130a-3p
A10	hsa-miR-32-5p	D06	hsa-miR-18a-5p	G02	hsa-let-7c
A11	hsa-miR-26b-5p	D07	hsa-miR-374a-5p	G03	hsa-miR-29c-3p
A12	hsa-let-7g-5p	D08	hsa-miR-423-5p	G04	hsa-miR-140-3p
B01	hsa-miR-30c-5p	D09	hsa-let-7a-5p	G05	hsa-miR-128
B02	hsa-miR-96-5p	D10	hsa-miR-124-3p	G06	hsa-let-7f-5p
B03	hsa-miR-185-5p	D11	hsa-miR-92a-3p	G07	hsa-miR-122-5p
B04	hsa-miR-142-3p	D12	hsa-miR-23a-3p	G08	hsa-miR-20a-5p
B05	hsa-miR-24-3p	E01	hsa-miR-25-3p	G09	hsa-miR-106b-5p
B06	hsa-miR-155-5p	E02	hsa-let-7e-5p	G10	hsa-miR-7-5p
B07	hsa-miR-146a-5p	E03	hsa-miR-376c-3p	G11	hsa-miR-100-5p
B08	hsa-miR-425-5p	E04	hsa-miR-126-3p	G12	hsa-miR-302c-3p
B09	hsa-miR-181b-5p	E05	hsa-miR-144-3p	H01	cel-miR-39
B10	hsa-miR-302b-3p	E06	hsa-miR-424-5p	H02	cel-miR-39
B11	hsa-miR-30b-5p	E07	hsa-miR-30a-5p	H03	SNORD61
B12	hsa-miR-21-5p	E08	hsa-miR-23b-3p	H04	SNORD68
C01	hsa-miR-30e-5p	E09	hsa-miR-151a-5p	H05	SNORD72
C02	hsa-miR-200c-3p	E10	hsa-miR-195-5p	H06	SNORD95
C03	hsa-miR-15b-5p	E11	hsa-miR-143-3p	H07	SNORD96A
C04	hsa-miR-223-3p	E12	hsa-miR-30d-5p	H08	RNU6-2
C05	hsa-miR-194-5p	F01	hsa-miR-191-5p	H09	miRTC
C06	hsa-miR-210	F02	hsa-let-7i-5p	H10	miRTC
C07	hsa-miR-15a-5p	F03	hsa-miR-302a-3p	H11	PPC
C08	hsa-miR-181a-5p	F04	hsa-miR-222-3p	H12	PPC

Tabla 7: Tabla con los miARNs que se analizaron en nuestras muestras

En la serie externa de validación, la cuantificación de la expresión de cada miARN seleccionado se realizó usando el kit TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante, y técnicas de cuantificación a tiempo real (Light Cyclor 480; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Las concentraciones relativas de cada uno de los miARN se calcularon por interpolación de una recta patrón, de cada respectivo miRNA, generada mediante diluciones seriadas de cDNA de diferentes líneas celulares. Las muestras fueron validadas independientemente para cada miARN, y se normalizaron utilizando el valor de la media del miARN evaluado.

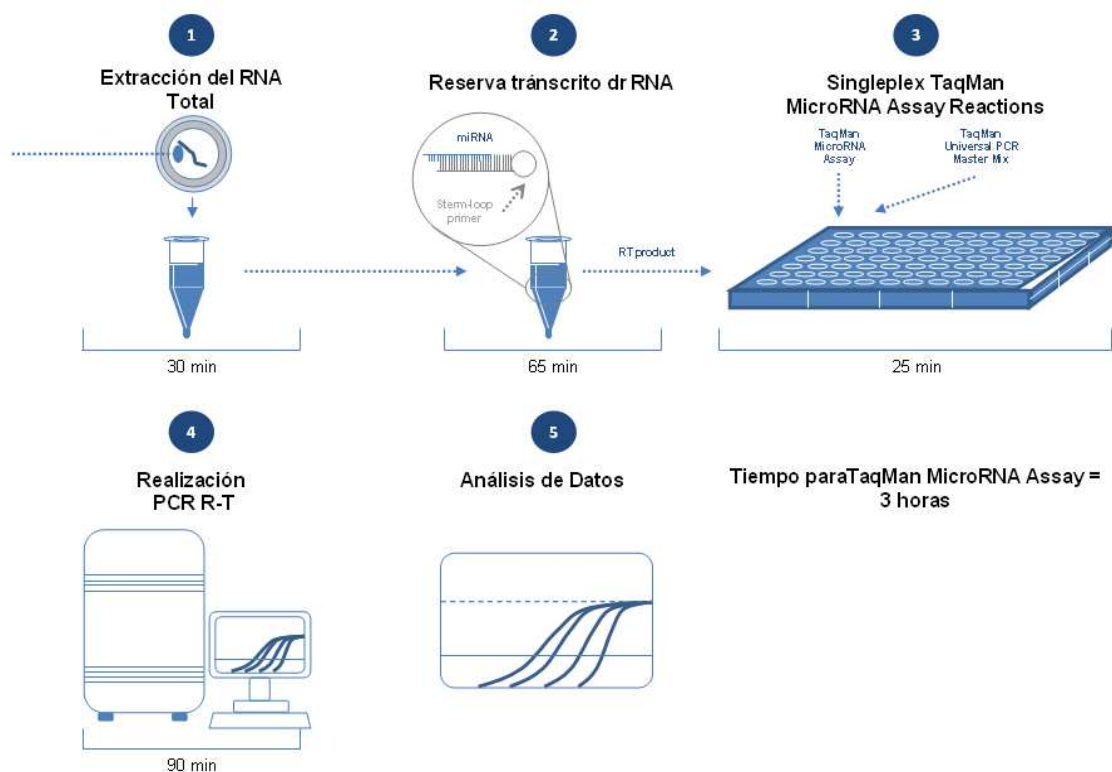


Figura 22: Imagen del resumen de la cuantificación de la expresión de miRNA en la serie externa de validación usando el kit TaqMan® MicroRNA Assay.

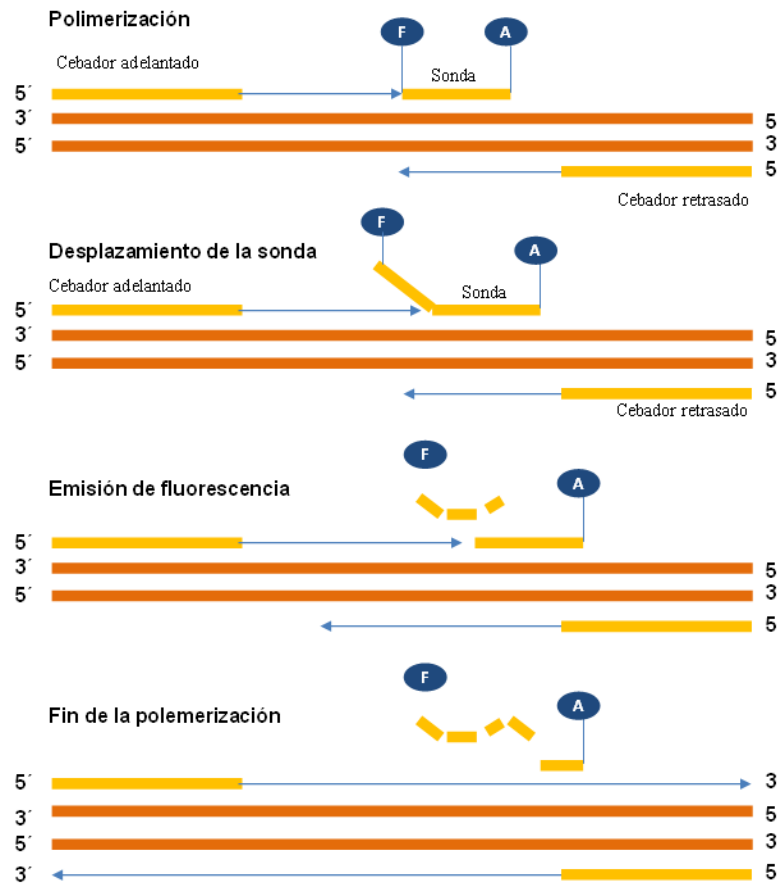


Figura 23: Esquema representativo de la técnica PCR cuantitativa a tiempo real. Kit Taqman® MicroRNA Assay. "F" representa al fluoróforo y "A" a la molécula que amortigua la fluorescencia usada en la serie de validación.

9.8. Array de proteínas (Citoquinas)

La tecnología de microarrays representa una plataforma de gran versatilidad para el análisis a gran escala de moléculas de distinto origen. Así, no sólo se han descrito arrays de ácidos nucleicos sino también se han ido desarrollando con tejidos, células, proteínas y anticuerpos entre otros. Los arrays de proteínas, y en nuestro caso concreto de citoquinas, se han aplicado al estudio de perfiles proteicos de extractos de tejidos, líneas celulares y fluidos biológicos para detectar simultáneamente múltiples antígenos basándose en su unión al anticuerpo.

Para determinar simultáneamente una selección de citoquinas, las proteínas extraídas de los exosomas de cada muestra se incubaron con membranas que contenían una matriz de 80 anticuerpos humanos contra citoquinas (Quantibody Human Cytokine Array 5, RayBiotech, Norcross, GA). Las membranas fueron sometidas durante 1 hora a una solución bloqueante y a continuación fueron tratadas y analizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Describiendo el proceso brevemente, el primer paso es biotinilar el amino primario de las proteínas en la muestra, a continuación se bloquea la membrana y la muestra marcada con biotina se añade a la matriz de la membrana que contiene los anticuerpos de captura. Se incuba con estreptavidina conjugada con HRP (del inglés, *Horseradish peroxidase*) para permitir la interacción de las proteínas diana. Después de la incubación, las señales se pueden visualizar por quimioluminiscencia.

Posición	Citoquina	Posición	Citoquina	Posición	Citoquina
1-6	Controles	33	MIP-1 β	59	Flt-3 Ligand
7	ENA-78	34	MIP-1 δ	60	Fractalkine
8	GCSF	35	RANTES	61	GCP-2
9	GM-CSF	36	SCF	88	GDNF
10	GRO	37	SDF-1	62	HGF
11	GRO- α	38	TARC	63	IGFBP-1
12	I-309	39	TGF- β 1	64	IGFBP-2
13	IL-1 α	40	TNF- α	65	IGFBP-3
14	IL-1 β	41	TNF- β	66	IGFBP-4
15	IL-2	42	EGF	67	IL-16
16	IL-3	43	IGF-I	68	IP-10
17	IL-4	44	Angiogenin	69	LIF
18	IL-5	45	Oncostatin M	70	LIGHT
19	IL-6	46	Thrombopoietin	71	MCP-4
20	IL-7	47	VEGF	72	MIFM
21	IL-8	48	PDGF-BB	73	IP-3 α
22	IL-10	49	Leptin	74	NAP-2
23	IL-12 p40p70	50	BDNF	75	NT-3
24	IL-13	51	BLC	76	NT-4
25	IL-15	52	Ck β 8-1	77	Osteopontin
26	INF- γ	53	Eotaxin	78	Osteoprotegerin
27	MCP-1	87	Eotaxin-2	79	PARC
28	MCP-2	54	Eotaxin-3	80	PIGF
29	MCP-3	55	FGF-4	81	TGF- β 2
30	MCSF	56	FGF-6	82	TGF- β 3
31	MDC	57	FGF-7	83	TIMP-1
32	MIG	58	FGF-9	84	TIMP-2

Tabla 8: Tabla- resumen de las citoquinas que fueron analizadas.

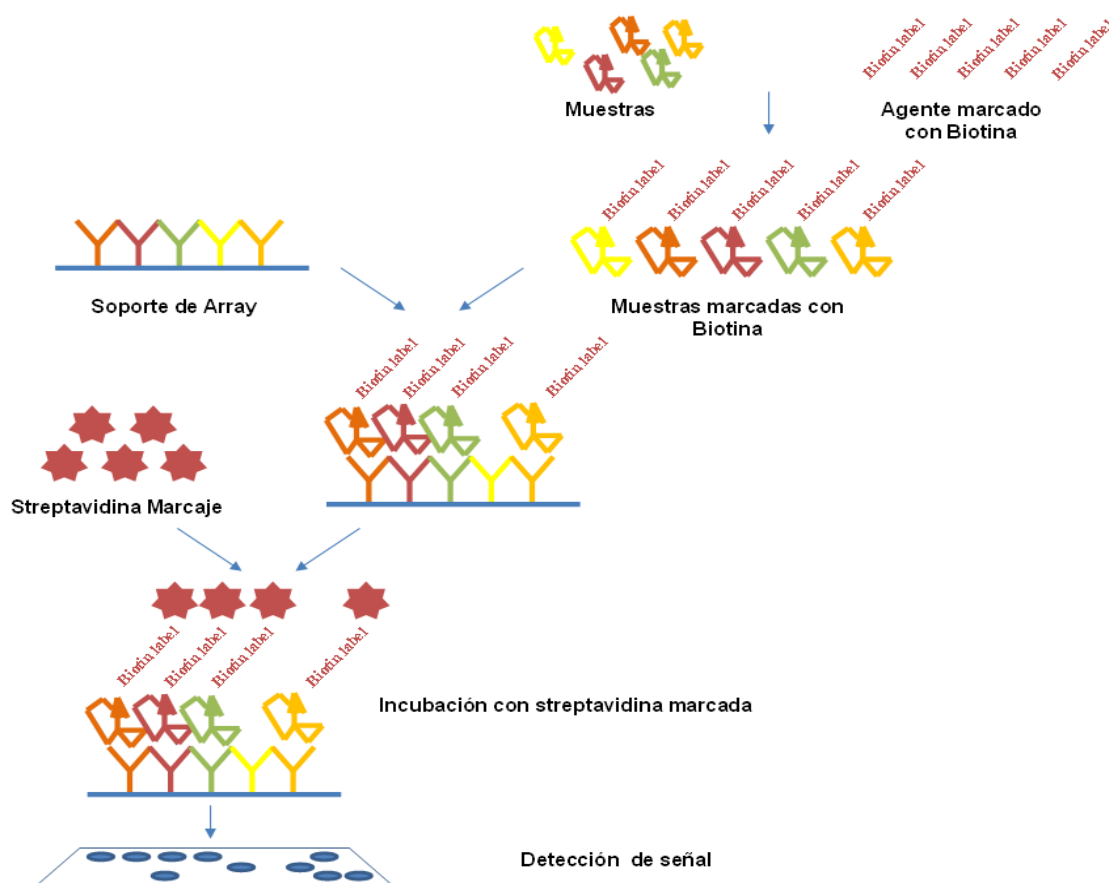


Figura 24: Imagen resumen del proceso de determinación de citoquinas (array de citoquinas) de las proteínas extraídas de los exosomas aislados según el kit Quantibody Human Cytokine Array 5.

9.9. Análisis de las funciones de los miARNs contenidos en los exosomas

Los microRNAs son pequeñas moléculas de ARN endógenas que regulan la expresión génica mediante la degradación y/o la represión traducional, afectando a muchos procesos biológicos. En nuestro estudio se analizó las funciones implicadas de los microRNA cuya expresión estaba desregulados 4 veces en las diferentes comparaciones realizadas (NTpl *vs* NTbal, Tpl *vs* Tbal, NTpl *vs* Tpl y NTbal *vs* Tbal). Para ello se usó el servidor web DNA Intelligent Analysis (DIANA)-miRPath v2.0. Este servidor web obtiene la información acerca de los miRNA y las rutas biológicas relacionadas con ellos de las bases

de datos miRBase 18 y “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) v58.1.

En nuestro estudio se seleccionaron las dianas de los miRNAs pronosticados *in silico* usando DIANA-microT-CDS, el cual predice la interacción miRNA-gen en el extremo 3'-UTR y en la secuencia codificante (CDS, del inglés *coding sequence*).

En el análisis de los efectos de múltiples miRNA, se analizaron las rutas implicadas para combinaciones de miRNA desregulados usando la opción “Union of Pathways” (Vlachos IS et al, 2012). En esta opción, el servidor calcula inicialmente los niveles de significación entre todas las posibles parejas microRNA-rutas realizando repetidamente el análisis de enriquecimiento para los miRNA seleccionados y todas las rutas disponibles. En un segundo paso de este proceso, el servidor combina los niveles de significación previamente calculados y proporciona un valor de p combinado para cada ruta aplicando el método de probabilidad de *Fisher*.

9.10. Análisis estadístico

El análisis de la concentración de exosomas en los diferentes grupos estudiados (NTpl, NTbal, Tpl y Tbal) mediante NanoSight se realizó por triplicado, y para calcular la significación estadística se utilizó el test t de *Student*.

Para el estudio de la concentración de exosomas en la serie completa de pacientes mediante el análisis de la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Para la visualización de las relaciones entre los niveles de enzima y los diferentes subgrupos analizados se usaron diagramas de caja, para los cuales se transformaba la variable cuantitativa (niveles de enzima) mediante el uso de logaritmo en base 10.

En el estudio de la serie de validación, se comprobó mediante pruebas de normalidad (test de *Kolmogorov-Smirnov*) que las variables de las medidas de expresión de los miRNAs no correspondían con una distribución normal. El test *U de Mann-Whitney* se utilizó para analizar la asociación entre los niveles de expresión de cada miRNA y la población, así como con el tipo muestral.

En la serie de validación, se analizaron las posibles asociaciones entre los niveles de miRNAs detectados en pacientes con patología tumoral y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor evolución de la enfermedad usando el test *U de Mann-Whitney* y el test de *Kruskal-Wallis*. Además, se evaluó el efecto sobre la supervivencia libre de enfermedad, libre de progresión y global generando las curvas de supervivencia con Kaplan-Meier y comparando las diferencias con el estadístico log-rank (test de Mantel-Cox).

En todos los tipos de análisis se consideraron valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS v14.0.

RESULTADOS

10. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS AISLADOS EN PLASMA Y EN LBA DE PACIENTES CON CP Y DE PACIENTES CON PATOLOGÍA NO TUMORAL

En este apartado del estudio se utilizó, por un lado, plasma de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y de pacientes con patología pulmonar no tumoral que utilizamos como controles para analizar la presencia de exosomas circulantes. Por otro lado, se utilizó LBA de los pacientes con patología tumoral pulmonar obtenido mediante FBC y de los controles sin enfermedad tumoral pulmonar que se sometían a esa prueba diagnóstica por alguna patología pulmonar no tumoral.

Para detectar la presencia de exosomas en cada una de las fuentes y tipo de pacientes comentados, se mezclaron 15 casos del mismo tipo en cada subgrupo. Los subgrupos establecidos fueron:

- Exosomas aislados del plasma de pacientes con CP (Tpl)
- Exosomas aislados de LBA de pacientes con CP (Tbal)
- Exosomas aislados de plasma de pacientes sin CP (NTpl)
- Exosomas aislados del LBA de los pacientes sin CP (NTbal)

Las 4 subpoblaciones fueron distribuidas de forma balanceada para minimizar sesgos en cuanto a edad, sexo y condición de fumador/no fumador. Para la identificación y cuantificación de exosomas fueron utilizados diferentes métodos.

10.1. Visualización de los exosomas de plasma y LBA mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal

La identificación de las muestras mediante microscopía se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 1010 JEM (Jeol Ltd., Tokio, Japan) 100kV entre 80.000 y 120.000 aumentos.

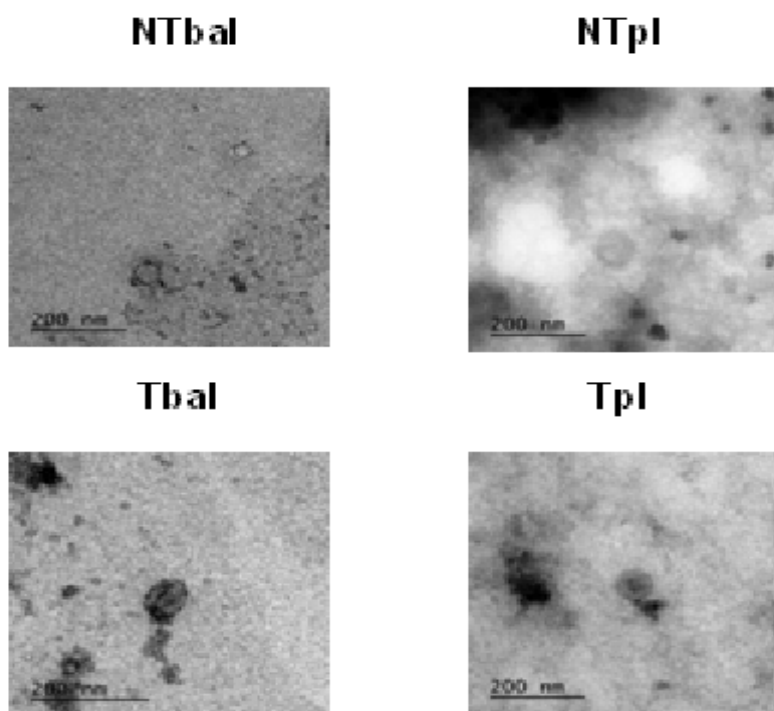


Figura 25. Exosomas visualizados mediante microscopia electrónica de transmisión en las cuatro muestras estudiadas NTpl, NTbal, Tpl and Tbal.

Como se puede observar en las imágenes de la figura, encontramos vesículas de morfología y tamaño concordante a la descrita en la literatura para los exosomas.

Por otro lado, gracias a las posibilidades que ofrece la microscopía confocal, también se usó para visualizar los exosomas. Para poder obtener las imágenes que se muestran a continuación, dado el pequeño tamaño de estas vesículas, se unieron a microesferas de poliestireno de mayor tamaño mediante el anticuerpo para la

proteína específica de exosomas CD63, tal como se explica en detalle en el apartado Material y Métodos. Los exosomas fueron visualizados mediante la fluorescencia (FITC) emitida por el anticuerpo unido a la proteína Ber-EP. Para ello dispusimos de un microscopio Leica TCS SP5 con el que se obtuvieron imágenes detectando fluorescencia con un aumento notable de resolución.

Las imágenes fueron capturadas a una velocidad de 400 Hz y con una resolución espacial de 1024 x 1024 pixel. Todas estas imágenes han sido tratadas con la aplicación informática Leica Application Suite 2.02.

Las imágenes obtenidas de los exosomas estudiados, gracias a la técnica descrita con anterioridad, se pueden observar en la siguiente figura:

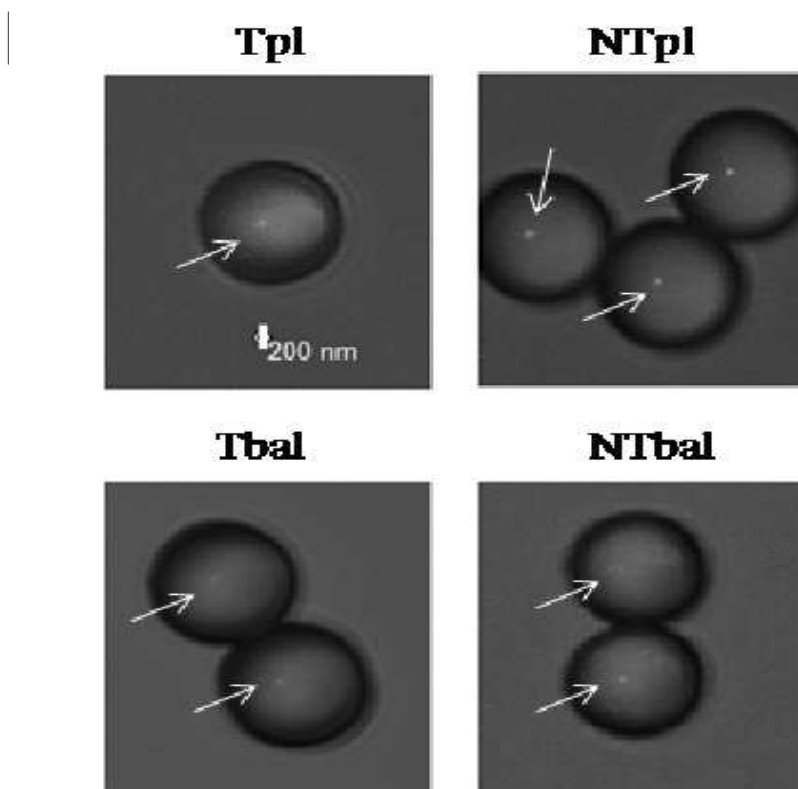


Figura 26: Exosomas visualizados mediante Microscopia Confocal en las diferentes muestras estudiadas (NTpl, NTbal, Tpl and Tbal.). Las flechas marcan los exosomas positivos para Ber-EP4-FITC.

Las nanovesículas estaban presentes, en mayor o menor cantidad, en todas las poblaciones estudiadas, distinguiendo su tamaño, que, como está especificado oscilaba alrededor de los 100 nm. Además, mostraban positividad para CD63 (imprescindible para la unión de los exosomas a las microesferas), que fue realmente visualizada mediante la fluorescencia (FITC) emitida por el anticuerpo unido a la proteína Ber-EP, de esta manera concluimos que dicha proteína exosomal estaba presente en las muestras aisladas.

10.2. Análisis del tamaño y cuantificación de las nanovesículas aisladas del plasma y LBA mediante tecnología NanoSight.

Para obtener más información sobre los exosomas aislados se utilizó tecnología Nanosight (LM10 nanoparticle characterization system), equipo que mide el tamaño y la carga de las partículas según el movimiento que realizan en función de los cambios de temperatura y viscosidad del medio, como se ha descrito previamente en este trabajo, y de esta manera, se pudo analizar la distribución y los niveles de los exosomas de las cuatro muestras, pudiendo obtener más información sobre sus características de tamaño y concentración.

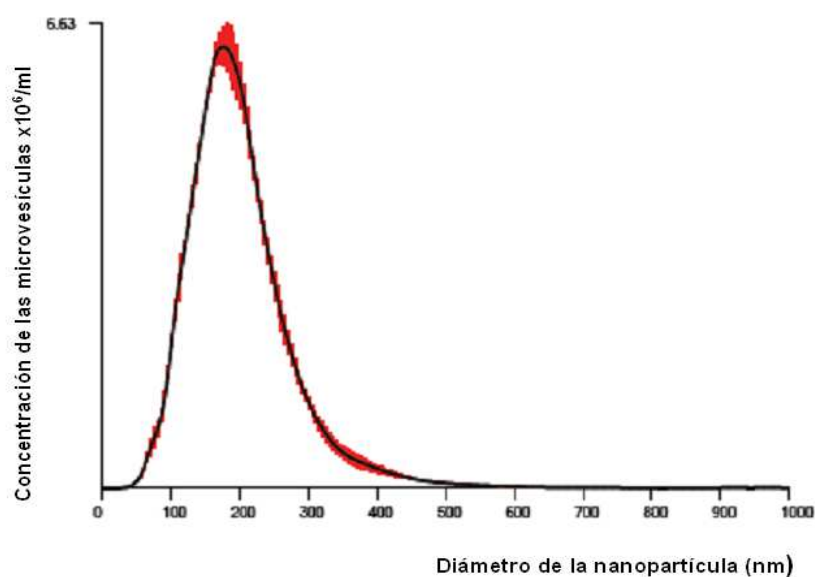


Figura 27: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight mostrando el tamaño de los exosomas aislados en muestra de LBA en pacientes sin patología oncológica

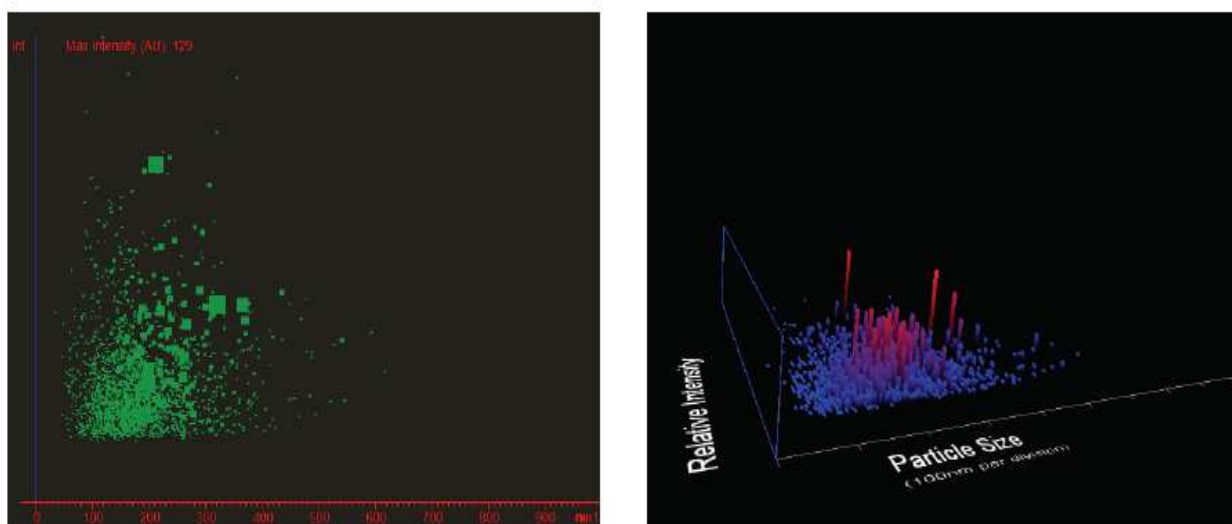


Figura 28: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight (representación tridimensional) mostrando el tamaño de los exosomas aislados en muestra de LBA en pacientes sin patología oncológica

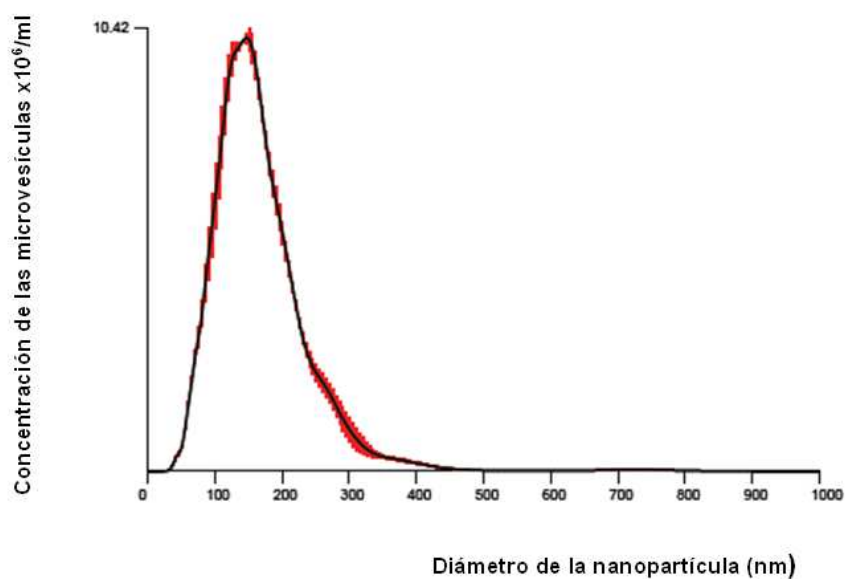


Figura 29: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight mostrando el tamaño de los exosomas aislados en muestra de Plasma de pacientes no tumorales

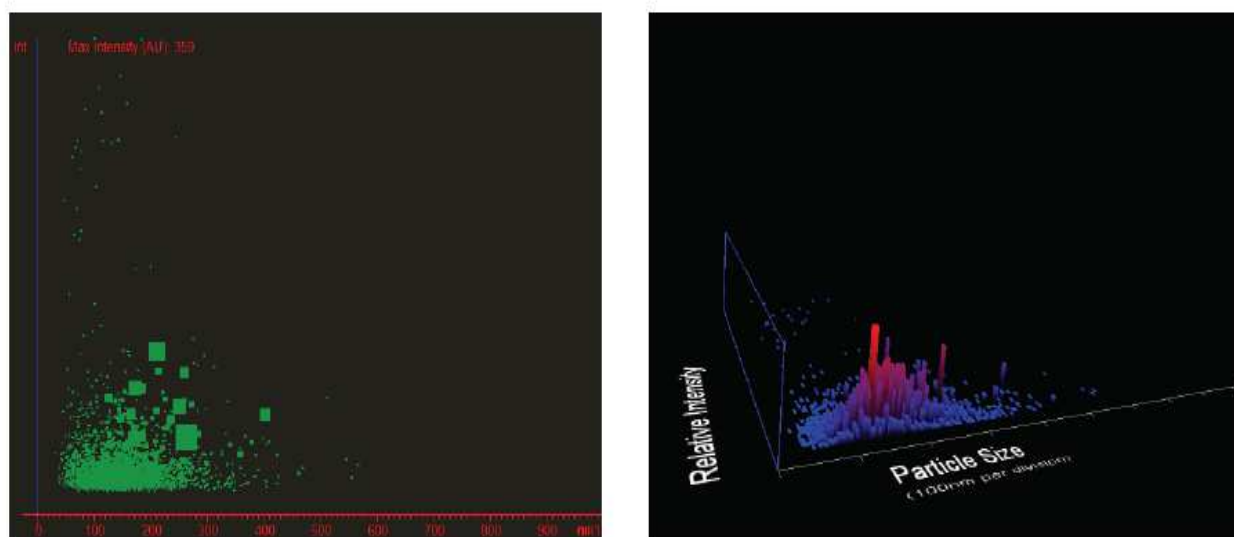


Figura 30: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight (representación tridimensional) mostrando el tamaño de los exosomas aislados en muestra de plasma de pacientes no tumorales

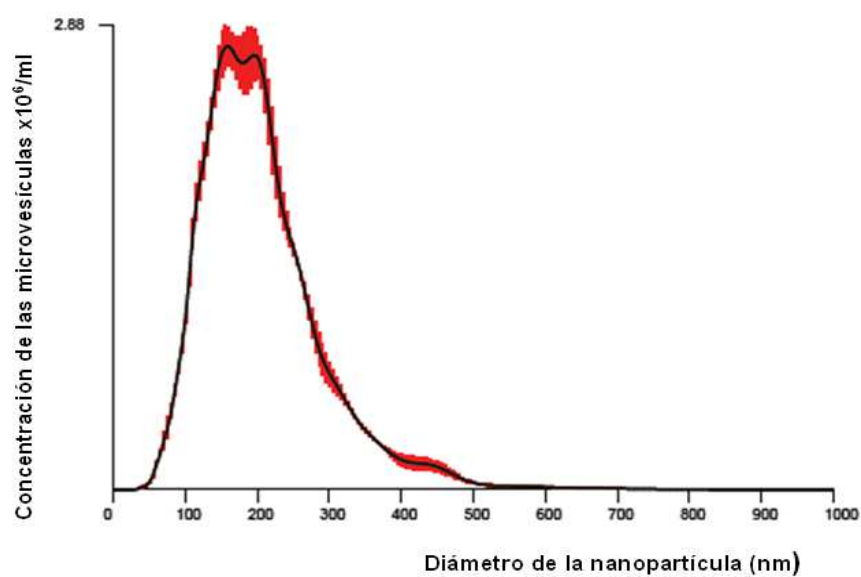


Figura 31: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight mostrando el tamaño de los exosomas aislados en la muestra de LBA en pacientes con cáncer de pulmón.

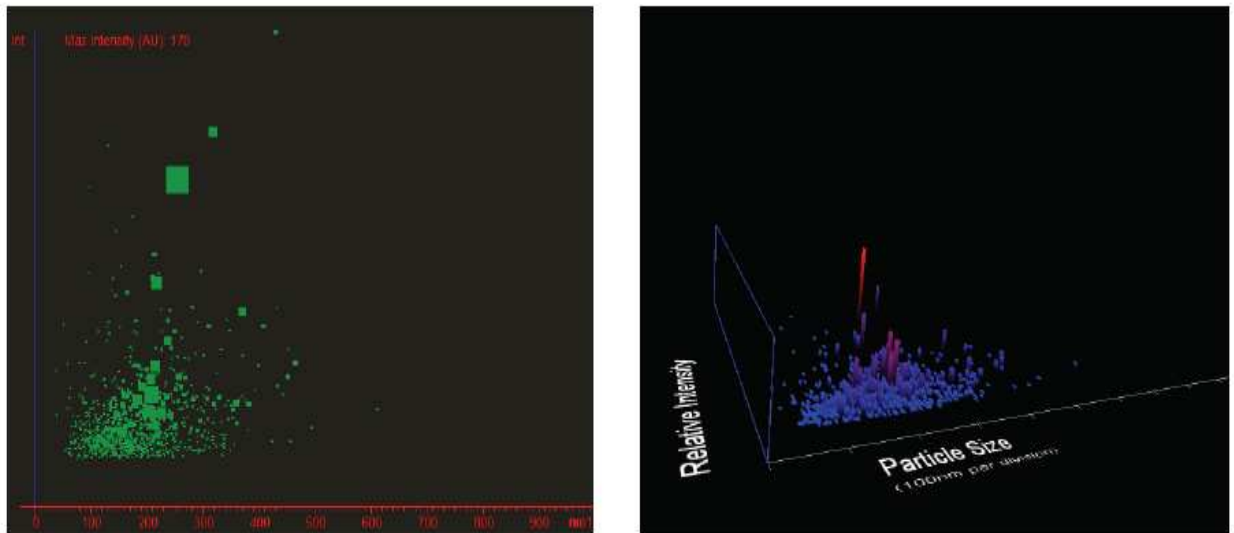


Figura 32: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight (representación tridimensional) mostrando el tamaño de los exosomas aislados en la muestra de LBA en pacientes con cáncer de pulmón

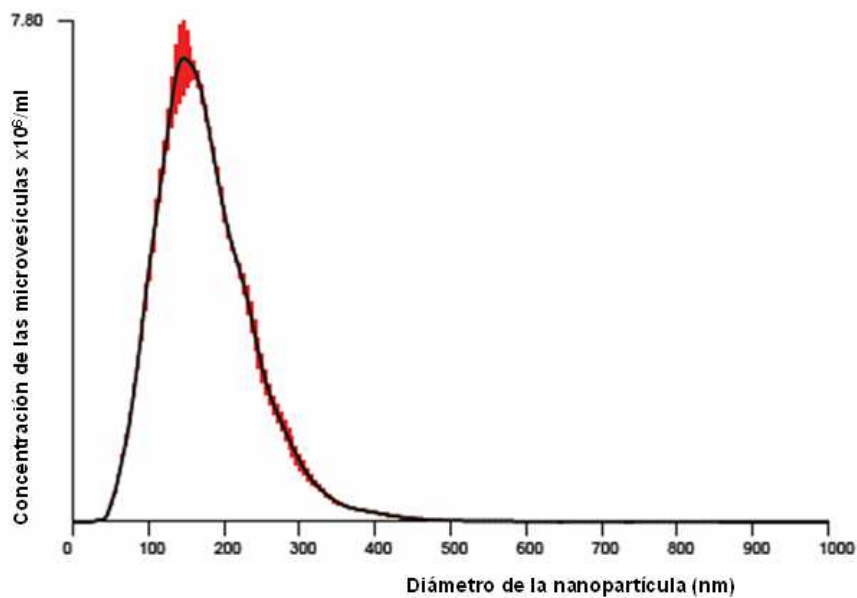


Figura 33: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight mostrando el tamaño de los exosomas aislados en la muestra de Plasma de pacientes con cáncer de pulmón

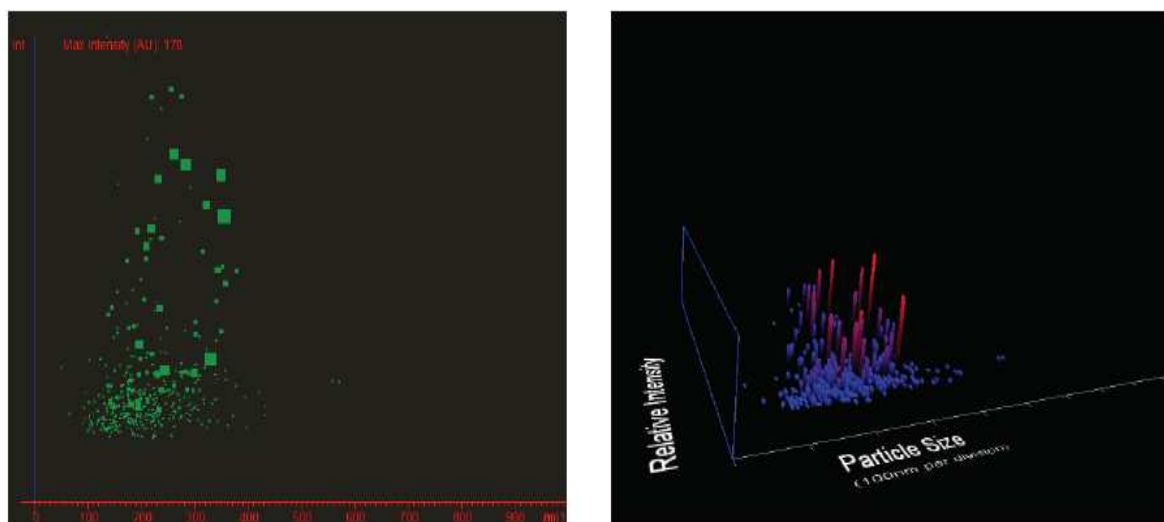


Figura 34: Resultado del análisis de las partículas mediante tecnología NanoSight (representación tridimensional) mostrando el tamaño de los exosomas aislados en la muestra de plasma de pacientes con cáncer de pulmón

El resultado del tamaño y distribución de los mismos está en relación y concuerda con lo descrito en la literatura sobre los exosomas, correspondiendo por tanto las muestras a este tipo de nanovesículas. Si nos fijamos en las gráficas obtenidas podemos observar que el tamaño de los exosomas aislados es similar y constante en cada una de las subpoblaciones estudiadas (NT bal NT pl Tbal T pla), independientemente de si se trata de pacientes afectados de cáncer o no.

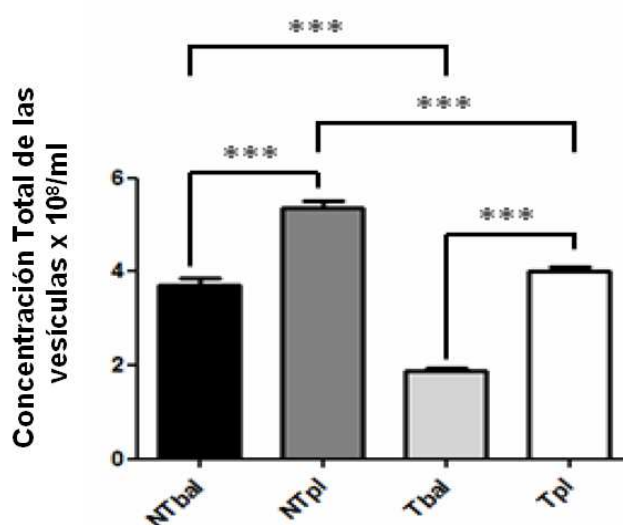


Figura 35: Concentración de los exosomas aislados en las cuatro muestras (***) $P < 0,001$ utilizando la tecnología Nanosight (LM 10 nanoparticle characterization system)

Tal como vemos en la figura previa, se encontró una concentración de exosomas significativamente superior en plasma que en LBA, esto concuerda con los datos publicados hasta ahora en la literatura, donde se demuestra la presencia de exosomas principalmente en plasma, planteando la hipótesis de su existencia en otros fluidos corporales. En este caso encontramos estas partículas también en LBA, pero en menor concentración.

Se observa además que la presencia de exosomas es significativamente superior en el plasma de pacientes tumorales comparativamente con el de pacientes que no presentan cáncer. Esta presencia más importante podría tener que ver con la posibilidad de que el material genético tumoral presente en exosomas se disemine por el plasma con el fin de llegar a otras partes del organismo dentro de los procesos de metástasis tumoral.

10.3. Detección de proteínas específicas de exosomas mediante inmunotransferencia en exosomas aislados de Plasma y LBA

Utilizamos como método para la detección de dichas proteínas la inmunotransferencia en las distintas muestras biológicas. Además, este método nos permitió hacernos una idea rápida de los niveles de esta proteína, y por lo tanto de los exosomas que contenían las muestras analizadas. Los pasos realizados para ello están descritos en el apartado Material y Métodos.

Para poder detectar la proteína de membrana exosomal CD63 utilizamos como marcaje un anticuerpo monoclonal de ratón específico para ella. Para las proteínas de membrana exosomal CD9 y Flotilina utilizamos marcajes con anticuerpos monoclonales de conejo específicos contra las mismas. Además, se utilizó Calnexina (proteína del retículo endoplasmático) como control negativo en las muestras.

En los resultados de dicho análisis encontramos la presencia de las proteínas específicas en todas las muestras de plasma de los pacientes, independientemente de presentar patología oncológica, por lo que demostramos la identificación y presencia en plasma de exosomas tanto si el paciente presentaba CP como en aquellos que no presentaban patología tumoral pulmonar.

Asimismo encontramos expresión de las proteínas exosomales en LBA de todos los pacientes, pero dicha expresión fue significativamente más reducida en las distintas muestras, si la comparamos con la mostrada en el plasma de los pacientes. En concreto, la tinción de CD9 era muy tenue en las muestras de LBA

Por el contrario todas las muestras tuvieron una expresión negativa del marcador Calnexina. Dichos resultados se pueden observar en la siguiente figura.

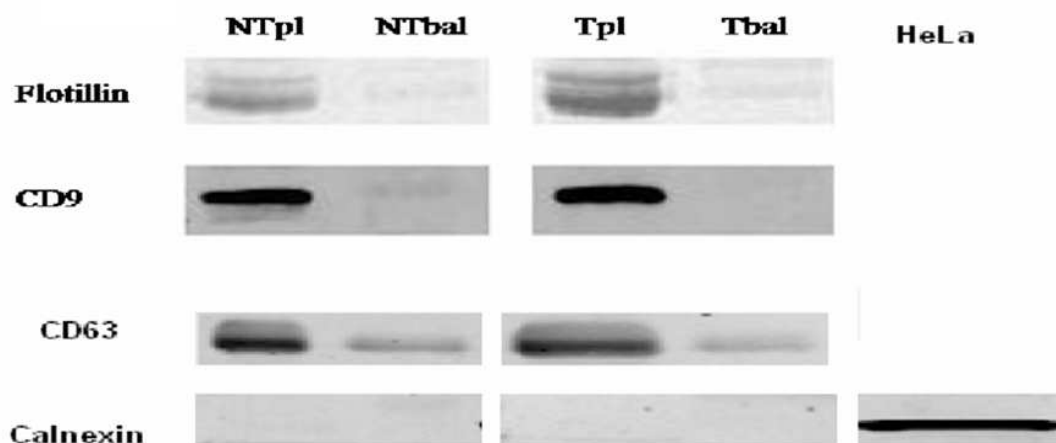


Figura 36: Inmunotransferencia utilizando CD63, CD9 y flotilina como marcadores específicos de exosomas extraídos de las muestras NTpl, NTbal, Tpl and Tbal y Calnexina como control negativo.

Como muestra la figura anterior, se observa una mayor densidad en las muestras de plasma, coincidiendo con una mayor presencia de material exosómico en estas muestras comparativamente con las muestras de LBA.

Las proteínas fueron detectadas, analizadas y cuantificadas mediante densitometría de banda, utilizando el sistema de imagen Odyssey® Infrared Imaging System.

11. CUANTIFICACIÓN DE LOS EXOSOMAS AISLADOS EN PLASMA Y EN LBA EN PACIENTES CON CP Y EN PACIENTES CON PATOLOGÍA NO TUMORAL MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE NIVELES DE ACETILCOLINESTERASA

Para cuantificar los exosomas del plasma y de LBA en la serie completa se utilizó, según se describe en Material y Métodos, el método de la Acetilcolinesterasa. De este modo se analizaron los niveles de exosomas en plasma y en LBA de 30 pacientes con CP y de 75 controles no tumorales.

Del total de los 30 pacientes con CP, se detectó la presencia de exosomas mediante la actividad de Acetilcolinesterasa en un 97% de las muestras de plasma y en un 93% de las muestras de LBA.

De los 75 pacientes de la serie control, sin enfermedad oncológica conocida, se detectó la presencia de exosomas en un 92% en la muestra de plasma y en un 89% en la muestra de LBA.

Parámetro		N	Rango promedio	Media	P
Tumor	Plasma	30	44	1,69103	p<0,001
	LBA	30	17	0,11840	
No tumor	Plasma	75	107,1	1,52319	p<0,001
	LBA	75	43,9	0,04749	
Plasma	Tumor	30	56,6	1,69103	p=0,441
	No tumor	75	51,6	1,52319	
LBA	Tumor	30	62,6	0,11840	p=0,040
	No tumor	75	49,2	0,04749	

Tabla 9: Relación entre los niveles de exosomas aislados en plasma y LBA en pacientes con CP y en los pacientes sin patología tumoral.

Cuando se hizo el análisis comparativo de los niveles de exosomas entre las diferentes subpoblaciones, utilizando la prueba de *Mann-Whitney*, se observó que existía una mayor presencia de los mismos en plasma que en LBA tanto en pacientes con CP (14,3 veces mayor; $p<0.001$) como sin patología oncológica (32 veces mayor; $p<0.001$)

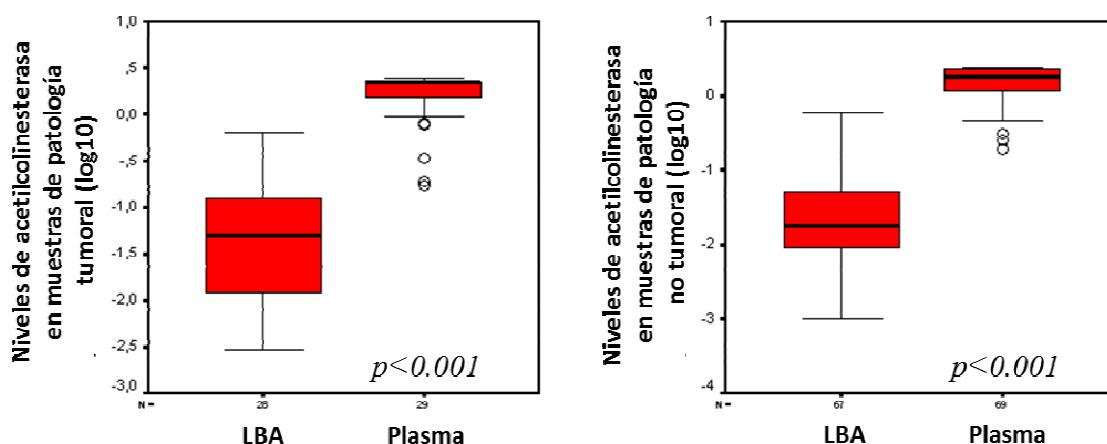


Figura 37: Diagrama de cajas que muestran la relación de los niveles de exosomas detectados en plasma *versus* LBA en las distintas patologías analizados por el método de Acetilcolinesterasa.

Además se encontró que en la muestra de plasma de ambas subpoblaciones no existían diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de exosomas encontrados independientemente de la patología (1,11 veces más en patología tumoral que en no tumoral; $p=0.441$).

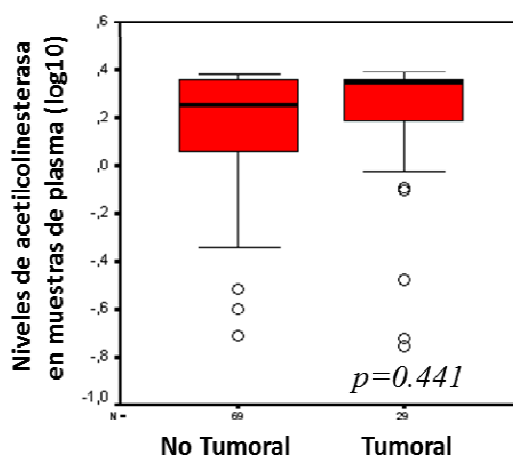


Figura 38: Diagrama de cajas que muestran la relación de los niveles de exosomas detectados en plasma en las distintas patologías analizados por el método de Acetilcolinesterasa.

Sin embargo, en las muestras de LBA existía más presencia de exosomas en aquellos pacientes con patología tumoral que en los pacientes que no presentaban patología oncológica, aunque existía una mayor dispersión de los datos (2.5 veces más en patología tumoral; $p=0.040$).

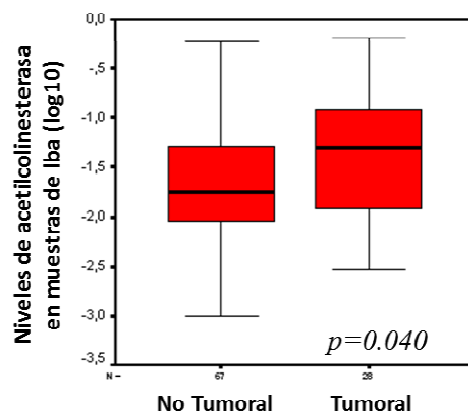


Figura 39: Diagrama de cajas que muestran la relación de los niveles de exosomas detectados en LBA en las distintas patologías analizados por el método de Acetilcolinesterasa.

Por tanto, basándonos en los niveles de exosomas analizados por el método de Acetilcolinesterasa podemos concluir que observamos claramente unos mayores niveles de exosomas en las muestras de plasma independientemente de la patología de la población estudiada.

12. PERFILES DE EXPRESIÓN DE miARNs CONTENIDOS EN LOS EXOSOMAS DE PLASMA Y LBA EN MUESTRAS AGRUPADAS DE PACIENTES CON CP Y EN PACIENTES CON PATOLOGÍA NO TUMORAL

Como ya se ha comentado anteriormente, se generaron 4 subgrupos mezclando 15 casos de cada respectivo subgrupo (Tbal, Tpl, NTbal y NTpl). En cada uno de los 4 subgrupos se analizó la expresión de miARNs utilizando el kit “miScript miRNA PCR array”, tal como se describe de forma detallada en el apartado de Material y Métodos. Mediante este kit se analizó la presencia y niveles de 84 miARNs simultáneamente usando cuantificación a tiempo real. Se analizó en los subgrupos y no de manera individual debido a la baja cantidad de ARN que se obtiene a partir de exosomas y también a que de este modo se reducía la variabilidad individual.

12.1. Número de miARNs detectados en las series definidas

Los resultados que se obtuvieron mostraban que de los 84 miARNs analizados en el PCR array, un 87% de los miARNs fueron detectados en las muestras de plasma y de LBA de pacientes con CP. Un 88% se encontraron en el LBA de pacientes sin CP y en menor cuantía, un 56 %, en muestras plasmáticas de pacientes sin patología oncológica.

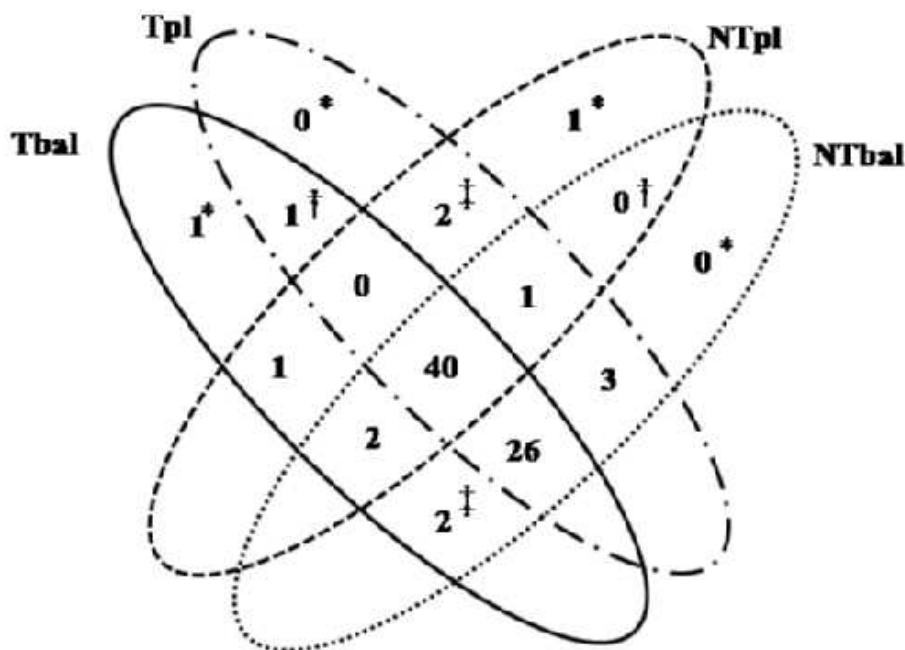


Figura 40: Número de miARNs detectados en los exosomas de las diferentes subpoblaciones, Tpl, NTpl, Tbal, Tpla, analizadas mediante el PCR array.

Como se puede extraer de la figura previa, encontramos un total de 40 miARNs que eran comunes para las 4 subpoblaciones, probablemente miARNs que tengan funciones generales celulares. Se encontraron 43 miARNs comunes en las muestras de plasma y 70 comunes en las muestras de LBA. También se detectaron 43 miARNs en la población sin patología oncológica, y un número más elevado de miARNs (67) en la población de pacientes con cáncer.

12.2. miARNs específicos en función del tipo de paciente y del tipo de muestra. Funciones afectadas por los mismos

Cuando se analizaron los distintos subgrupos, así como según el tipo de paciente (tumoral y no tumoral) y el tipo de muestra (plasma y LBA), se detectaron miARNs específicos. En función del tipo de población estudiada, se observó que miR-122 se detectaba de manera específica en las muestras de pacientes con tumor, no detectándose en las muestras de la población libre de tumor. No se detectó ningún miARN que se encontrara de manera específica en las muestras de pacientes con

patología no tumoral (común en plasma y en LBA). Cuando se estudió en función del tipo de muestra (plasma *vs* LBA), se detectaron dos miARNs de manera específica en las muestras de plasma, el miR-126 y miR-144, y otros dos miARNs en las muestras de LBA específicamente, el miR-302a y miR-302c.

El análisis de miARNs específicos para cada uno de los 4 subgrupos por separado (Tpl, Tbal, NTpl, NTbal) objetivó la presencia específica de miR-143 en el LBA de las muestras tumorales y el miR-128 únicamente en las muestras de plasma de pacientes con patología no tumoral. Sin embargo, ningún miARNs fue hallado de manera específica en las muestras de LBA de pacientes con patología no tumoral ni en las muestras de plasma de pacientes con tumor. Las funciones de los miARNs específicos identificados están recogidas en la siguiente tabla.

Lugar detectado	miARN	Funciones
Patología tumoral	miR-122	Angiogénesis Regulación ciclo celular Regulación hESC miARN supresores tumor
Plasma	miR-126	Angiogénesis Regulación hESC Inmunidad Inflamación miARN supresores tumor
	miR-144	Activación de caspasas Apoptosis EMT Regulación hESC
LBA	miR-302a	Regulación hESC
	miR-302c	Regulación hESC
Plasma en patología no tumoral	miR-128	Muerte celular Motilidad celular Regulación hESC
LBA en patología tumoral	miR-143	Regulación ciclo celular Muerte celular Diferenciación celular Proliferación celular Regulación hESC Inmunidad Inflamación miARN supresores tumor

Tabla 10: Funciones relacionadas con los miARNs específicos encontrados en las distintas muestras.

12.3. miARNs con mayores niveles detectados en las distintas poblaciones definidas. Funciones relacionadas

Los 10 miARNs detectados en mayor cuantía en cada una de las poblaciones definidas (Tpl, Tbal, NTpl y NTbal) se detallan en la tabla siguiente:

Tpl	Tbal	NTpl	NTbal
miR-16	miR-21	miR-16	miR-21
miR-20a	let-7b	miR-20a	miR-26a
miR-195	miR-200c	let-7b	miR-200c
let-7a	miR-92a	miR-92a	miR-29c
miR-223	miR-222	miR-26a	let-7b
miR-21	miR-26a	miR-142-3p	let-7a
let-7b	miR-141	miR-93	miR-141
miR-106b	let-7a	miR-144	miR-92a
miR-92a	miR-29c	miR-17	miR-99a
let-7g	miR-24	let-7d	miR-29a

Tabla 11: miARNs con mayores niveles en las diferentes muestras estudiadas Tpl, Tbal, NTpl, NTbal.

Como se puede apreciar en la tabla presentada, se constata la presencia de algunos miARNs en cantidades muy elevadas en varias poblaciones. El miR-16 es un miARN que se detecta en altos niveles en plasma tanto en pacientes tumorales como no tumorales. Observamos también la presencia de miR-20a en muestras plasmáticas, pero no presentes en muestras de LBA.

Por otro lado, el miR-21, miR-200c, miR-141, miR-26a, miR-141, let 7a, miR-29c son comunes y de los más detectados en muestras de LBA tanto en población tumoral como sin patología tumoral. Estas dos muestras son las que comparten un mayor número de miARNs similares detectados en altos niveles. El miARN let-7b y miR-92a sin embargo, se detectan en altos niveles en todo tipo de muestras (plasma o LBA) independientemente de si se trata de pacientes afectos de tumor o no.

Todos estos hallazgos están en probable relación con las funciones específicas de dichos miARNs dentro de la aritmética celular. Las funciones que encontramos relacionadas con los miARNs hallados en las muestras plasmáticas están expuestas en los siguientes gráficos:

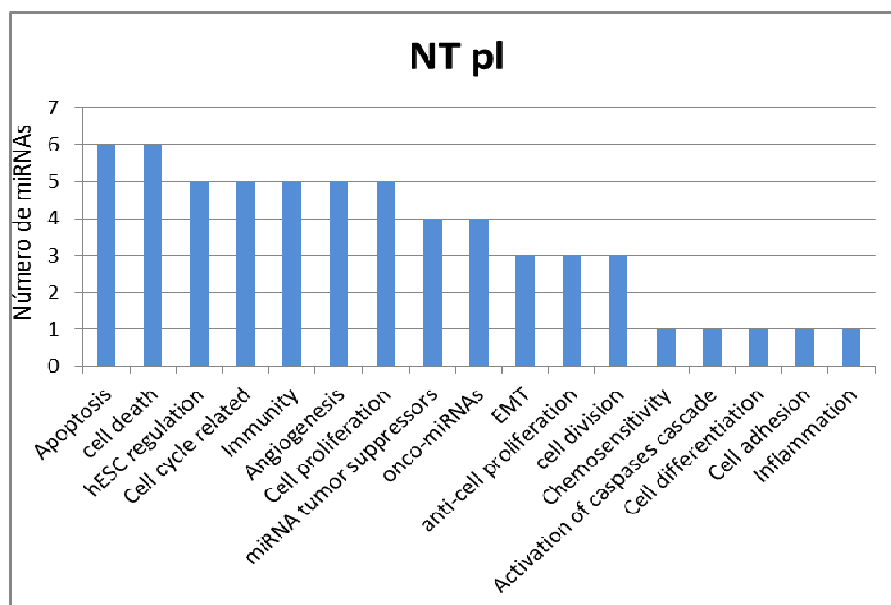
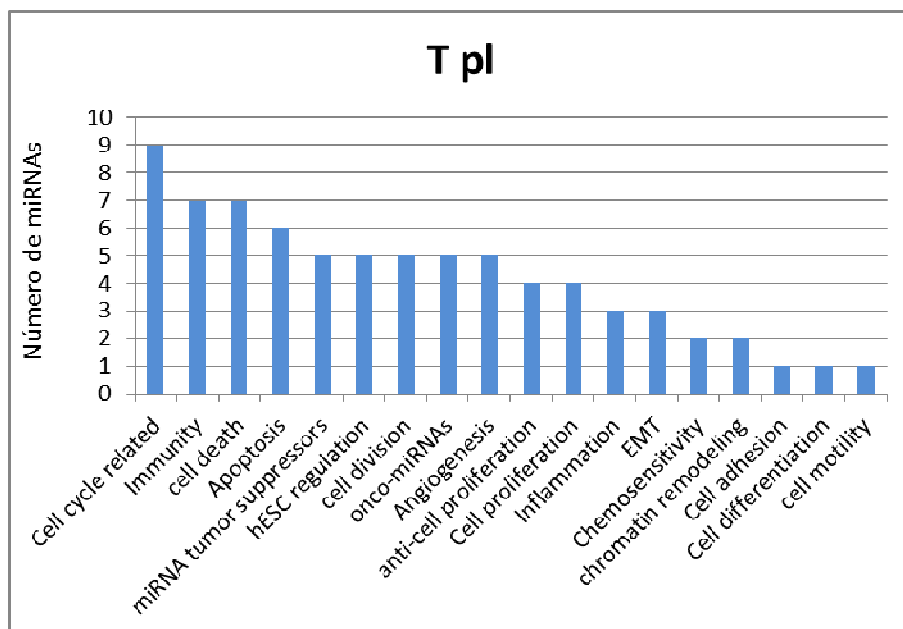


Figura 41 y 42: Funciones afectadas por los miARNs con mayores niveles encontrados en las muestras plasmáticas, de pacientes con cáncer y sin patología oncológica respectivamente. La figura muestra el número de miARNs detectados y las funciones relacionadas con la biología tumoral.

Si nos fijamos con detalle en la figura cabría destacar que el mayor número de miARNs presentes en ambas poblaciones tienen funciones relacionadas con la regulación del ciclo celular así como con la regulación de muerte celular. Son funciones claves dentro del sistema de control celular.

Observamos que en el subgrupo de plasma tumoral existen más miARNs que están relacionados con la regulación del ciclo celular que en la muestra de patología no tumoral, lo cual podría deberse a la mayor desregulación del ciclo celular que se da en las células tumorales. Existen también miARNs con funciones relacionadas con la inmunidad, apoptosis y muerte celular. En menor cantidad, pero también presente en ambas poblaciones, encontramos miARNs con funciones relacionadas con la motilidad y movilidad celular.

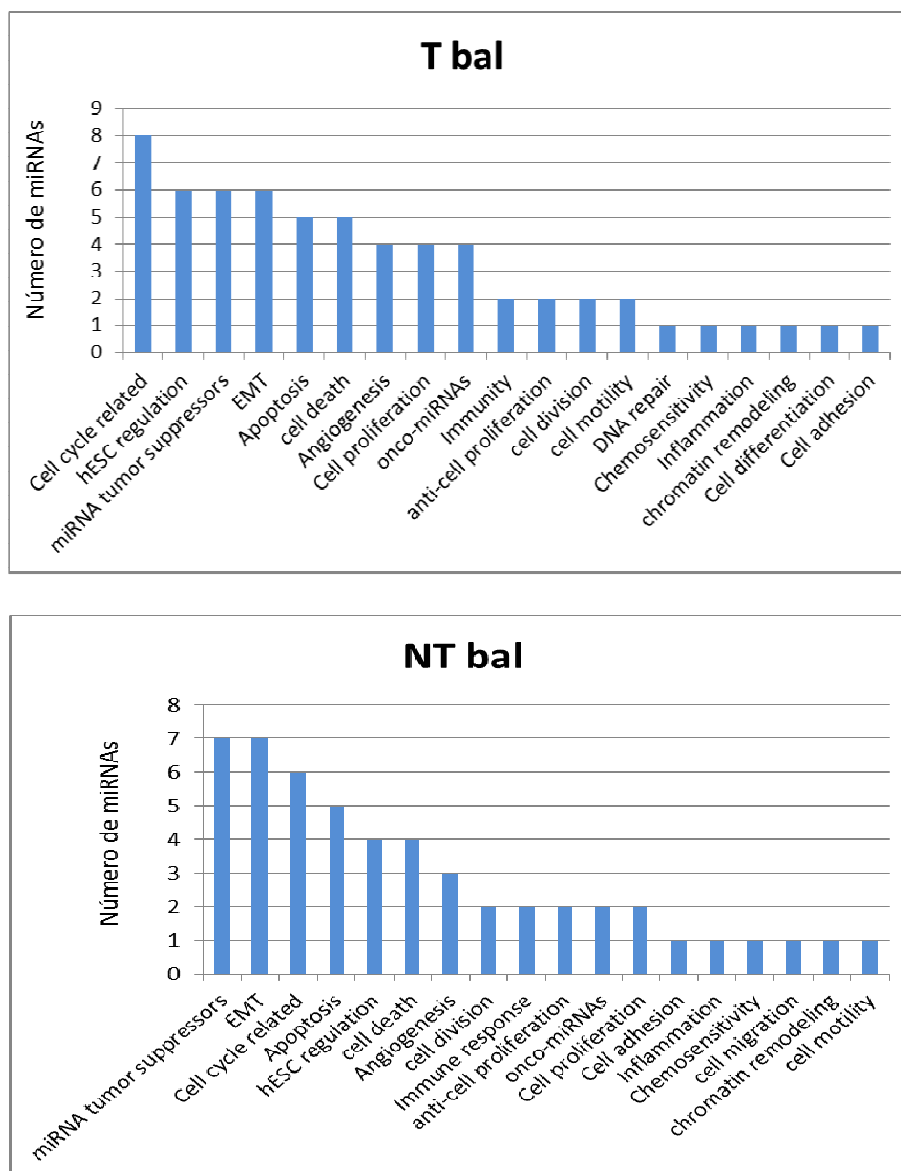


Figura 43 y 44: Funciones afectadas por los miARNs con mayores niveles encontrados en las muestras de LBA, de pacientes con cáncer y sin patología oncológica respectivamente. La figura muestra el número de miARNs detectados y las funciones relacionadas con la biología tumoral.

En cuanto a las funciones más representativas de los miARNs hallados en las muestras de LBA, podemos ver de forma más explícita en las figuras previas, que también las más repetidas tienen que ver con funciones relacionadas con el ciclo celular. Llama la atención que están presentes en mayor representación que en las muestras de plasma las funciones que tienen que ver con la transición epitelio mesénquima, tanto en los miARNs de LBA en pacientes tumorales como sin patología tumoral.

12.4. Estudio de los miARNs desregulados en las muestras agrupadas en función del tipo de población y del tipo de muestra. Comparaciones entre tipos de pacientes y tipos de muestra

Los niveles de miARNs detectados en los exosomas fueron comparados de diferentes maneras:

- Para ver variaciones entre el plasma y LBA en el mismo tipo de pacientes:
 - Plasma *vs* LBA en pacientes con CP
 - Plasma *vs* LBA en pacientes con patología no tumoral
- Para ver variaciones en el mismo tipo de muestra en función de la patología:
 - Tumor *vs* no tumor en muestras de plasma
 - Tumor *vs* no tumor en muestras de LBA

Cuando se realizó dichas comparativas, se observaron diferencias en la cantidad de miARNs desregulados en las distintas subpoblaciones. Estas diferencias están expuestas en la siguiente gráfica.

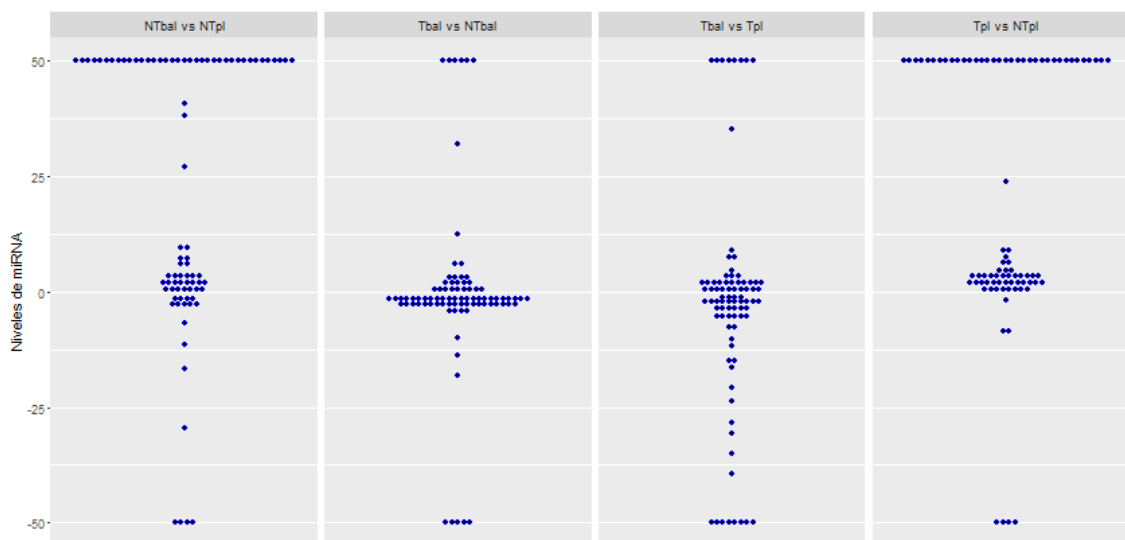


Figura 45: Imagen que recoge las diferencias en la cantidad de miARNs desregulados en las distintas subpoblaciones según las distintas comparativas.

Para hacer la comparativa del porcentaje de miARNs con niveles elevados según el tipo de población y tipo de muestra, se puso un punto de corte (4 veces más) y a partir de ahí se dividió su expresión en:

- Altos niveles: aquel miARN cuyos niveles detectados en un grupo son, al menos, 4 veces mayores que en el otro grupo con el que se compara.
- Niveles equivalentes: aquel miARN cuyos niveles detectados en un grupo están por debajo de 4 veces más cuando se compara con sus niveles detectados en el otro grupo.

La siguiente tabla recoge la información detallada y desglosada por tipo de miARN específico y sus niveles en cada una de las poblaciones. Se muestran los niveles de miARNs desregulados (diferencia mayor de 4 veces) detectados según las distintas comparativas:

Símbolo	Tbal vs Tpl	Símbolo	NTbal vs NTpl
hsa-miR-96-5p	↑	hsa-miR-150-5p	↑
hsa-miR-210	↑	hsa-miR-27b-3p	↑
hsa-miR-28-5p	↑	hsa-miR-32-5p	↑
hsa-miR-141-3p	↑	hsa-let-7g-5p	↑
hsa-miR-143-3p	↑	hsa-miR-30c-5p	↑
hsa-miR-302a-3p	↑	hsa-miR-185-5p	↑
hsa-miR-196b-5p	↑	hsa-miR-24-3p	↑
hsa-miR-302c-3p	↑	hsa-miR-146a-5p	↑
hsa-miR-200c-3p	35,2610	hsa-miR-425-5p	↑
hsa-miR-124-3p	8,8766	hsa-miR-30b-5p	↑
hsa-miR-125b-5p	8,2249	hsa-miR-21-5p	↑
hsa-miR-99a-5p	6,9644	hsa-miR-30e-5p	↑
hsa-miR-100-5p	4,5631	hsa-miR-200c-3p	↑
hsa-miR-29b-3p	4,1125	hsa-miR-15b-5p	↑
hsa-miR-140-3p	-4,0000	hsa-miR-125b-5p	↑
hsa-let-7g-5p	-4,1699	hsa-miR-99a-5p	↑
hsa-miR-19b-3p	-4,7568	hsa-miR-125a-5p	↑
hsa-miR-26b-5p	-5,0281	hsa-miR-141-3p	↑
hsa-miR-15a-5p	-5,2416	hsa-let-7a-5p	↑
hsa-miR-106b-5p	-5,2416	hsa-miR-424-5p	↑
hsa-miR-194-5p	-5,8159	hsa-miR-151a-5p	↑
hsa-let-7f-5p	-5,8563	hsa-miR-195-5p	↑
hsa-miR-18a-5p	-7,4127	hsa-miR-30d-5p	↑
hsa-let-7i-5p	-7,9447	hsa-miR-191-5p	↑
hsa-miR-17-5p	-10,4107	hsa-let-7i-5p	↑
hsa-miR-103a-3p	-11,7127	hsa-miR-302a-3p	↑
hsa-miR-19a-3p	-14,7230	hsa-miR-222-3p	↑
hsa-miR-185-5p	-15,0324	hsa-miR-19b-3p	↑
hsa-miR-122-5p	-16,3362	hsa-miR-196b-5p	↑
hsa-miR-25-3p	-20,8215	hsa-miR-130a-3p	↑
hsa-miR-20a-5p	-23,5883	hsa-let-7c	↑
hsa-miR-142-3p	-28,4430	hsa-miR-29c-3p	↑
hsa-miR-195-5p	-30,6965	hsa-miR-140-3p	↑
hsa-miR-101-3p	-35,0174	hsa-let-7f-5p	↑
hsa-miR-16-5p	-39,3966	hsa-miR-106b-5p	↑
hsa-miR-142-5p	↓	hsa-miR-7-5p	↑
hsa-miR-32-5p	↓	hsa-miR-302c-3p	↑
hsa-miR-146a-5p	↓	hsa-miR-181a-5p	40,7859
hsa-miR-15b-5p	↓	hsa-miR-29a-3p	38,0546
hsa-miR-223-3p	↓	hsa-miR-29b-3p	27,0958
hsa-miR-126-3p	↓	hsa-miR-223-3p	9,8492
hsa-miR-144-3p	↓	hsa-miR-23b-3p	9,3179
hsa-miR-130a-3p	↓	hsa-miR-26b-5p	7,5685
		hsa-miR-22-3p	6,9163
		hsa-miR-30a-5p	6,6346
		hsa-miR-26a-5p	5,3517
		hsa-let-7e-5p	4,0000
		hsa-miR-16-5p	-6,8685
		hsa-miR-124-3p	-11,3137
		hsa-miR-18a-5p	-16,7955
		hsa-miR-142-3p	-29,4460
		hsa-miR-96-5p	↓
		hsa-miR-126-3p	↓
		hsa-miR-144-3p	↓
		hsa-miR-128	↓

Símbolo	Tpl vs NTpl	Símbolo	Tbal vs NTbal
hsa-miR-150-5p	↑	hsa-miR-96-5p	↑
hsa-miR-27b-3p	↑	hsa-miR-424-5p	↑
hsa-miR-32-5p	↑	hsa-miR-143-3p	↑
hsa-let-7g-5p	↑	hsa-miR-122-5p	↑
hsa-miR-30c-5p	↑	hsa-miR-7-5p	↑
hsa-miR-185-5p	↑	hsa-miR-302c-3p	↑
hsa-miR-24-3p	↑	hsa-miR-196b-5p	32,0000
hsa-miR-146a-5p	↑	hsa-miR-124-3p	12,3805
hsa-miR-425-5p	↑	hsa-miR-185-5p	6,4086
hsa-miR-30b-5p	↑	hsa-miR-18a-5p	5,6569
hsa-miR-21-5p	↑	hsa-miR-26b-5p	-4,1989
hsa-miR-30e-5p	↑	hsa-miR-103a-3p	-4,9246
hsa-miR-15b-5p	↑	hsa-miR-28-5p	-9,9866
hsa-miR-223-3p	↑	hsa-miR-125a-5p	-13,8326
hsa-miR-125b-5p	↑	hsa-miR-101-3p	-18,2522
hsa-miR-99a-5p	↑	hsa-miR-142-5p	↓
hsa-miR-125a-5p	↑	hsa-miR-32-5p	↓
hsa-let-7a-5p	↑	hsa-miR-146a-5p	↓
hsa-miR-424-5p	↑	hsa-miR-130a-3p	↓
hsa-miR-151a-5p	↑	hsa-miR-15b-5p	↓
hsa-miR-195-5p	↑		
hsa-miR-30d-5p	↑		
hsa-miR-191-5p	↑		
hsa-let-7i-5p	↑		
hsa-miR-222-3p	↑		
hsa-miR-19b-3p	↑		
hsa-miR-196b-5p	↑		
hsa-miR-130a-3p	↑		
hsa-let-7c	↑		
hsa-miR-29c-3p	↑		
hsa-miR-140-3p	↑		
hsa-let-7f-5p	↑		
hsa-miR-122-5p	↑		
hsa-miR-106b-5p	↑		
hsa-miR-7-5p	↑		
hsa-miR-200c-3p	23,9176		
hsa-miR-26b-5p	9,0631		
hsa-miR-181a-5p	9,0005		
hsa-miR-29a-3p	7,6211		
hsa-miR-22-3p	6,4531		
hsa-miR-142-5p	6,1903		
hsa-miR-23b-3p	4,7568		
hsa-miR-186-5p	4,3169		
hsa-miR-101-3p	4,2281		
hsa-miR-103a-3p	4,0558		
hsa-miR-124-3p	-8,1117		
hsa-miR-210	-8,9383		
hsa-miR-96-5p	↓		
hsa-miR-28-5p	↓		
hsa-miR-141-3p	↓		
hsa-miR-128	↓		

Tabla 12. Niveles detectados de cada miARN mediante las comparaciones de las distintas subpoblaciones.

↑: ≥50 veces sobreexpresado; ↓: ≥50 veces infraexpresado

De este modo, encontramos los siguientes resultados de miARNs desregulados:

- En la población de pacientes sin patología tumoral, un 34,5% de los miARNs identificados son expresados de la misma manera independientemente si es en plasma o en LBA (NTpl y NTbal). Además, el mayor porcentaje de miARNs con elevados niveles era detectado en las muestras de LBA (56%), mientras que sólo un 9.5% eran encontrados elevados en las muestras de plasma.

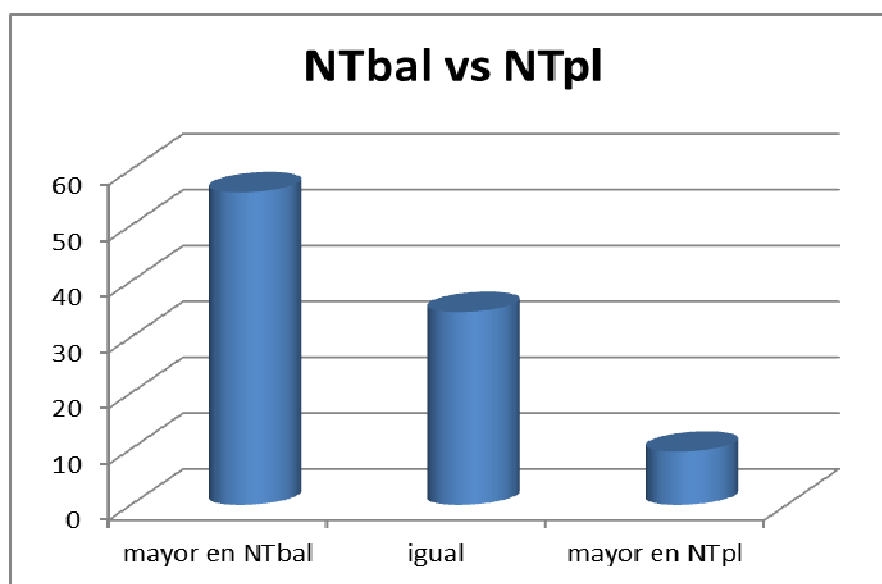


Figura 46; Representación gráfica del porcentaje de los miARNs identificados expresados de la misma manera independientemente si es en plasma o en LBA en pacientes sin patología tumoral

- En la población de pacientes con tumor se objetiva un alto porcentaje de miARNs con elevados niveles en plasma (34.5%), mientras que en LBA este porcentaje es menor (16.7%). Se consideraron niveles similares entre LBA y plasma en el 48.8% de los miARNs.

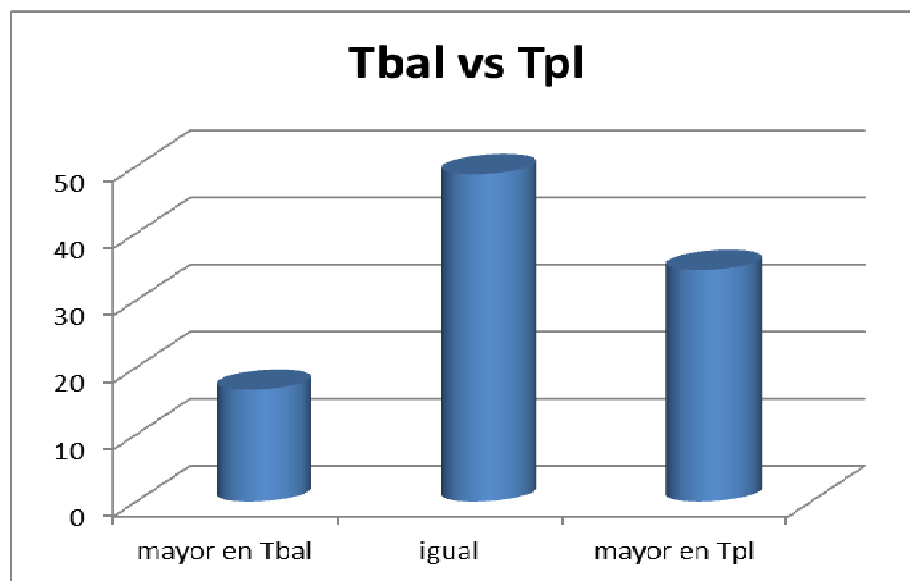


Figura 47; Representación gráfica del porcentaje de los miARNs identificados expresados de la misma manera independientemente si es en plasma o en LBA en pacientes con patología tumoral

- Cuando se realiza la comparativa entre las distintas poblaciones con la misma muestra, un 53.6% de los miARNs con elevados niveles se detectaron en muestras de plasma de pacientes con patología tumoral, y únicamente un 7.1% en plasma de pacientes con patología no tumoral.

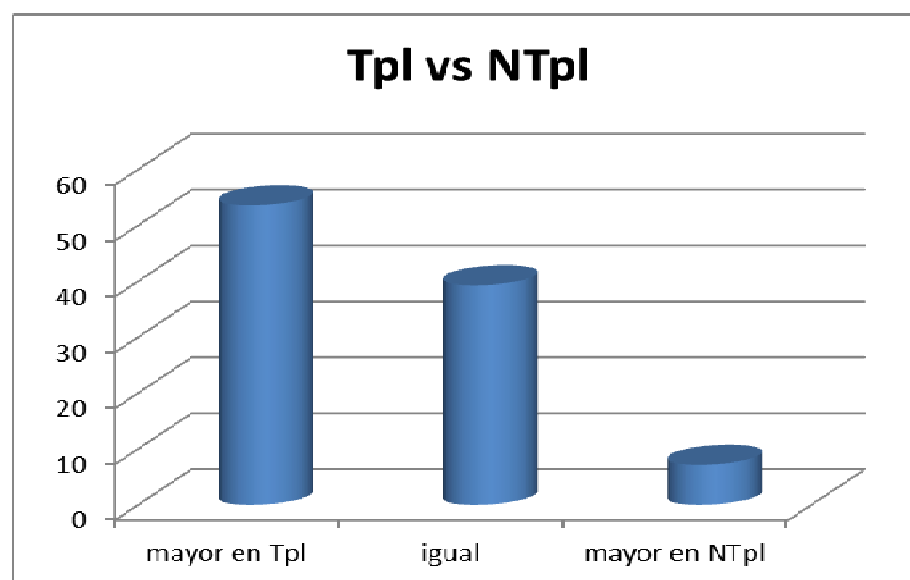


Figura 48: Representación gráfica del porcentaje de los miARNs identificados expresados de la misma manera independientemente si es patología tumoral o no tumoral en muestras de plasma

- En cuanto al porcentaje de miARNs con elevados niveles en muestras de LBA se objetiva una similitud entre las dos poblaciones, ya que un 11,9% de miARNs elevados es detectado tanto en pacientes con CP como en pacientes sin patología tumoral. Así, la gran mayoría de miARNs en LBA, un 76,2%, muestran niveles similares en ambas poblaciones.

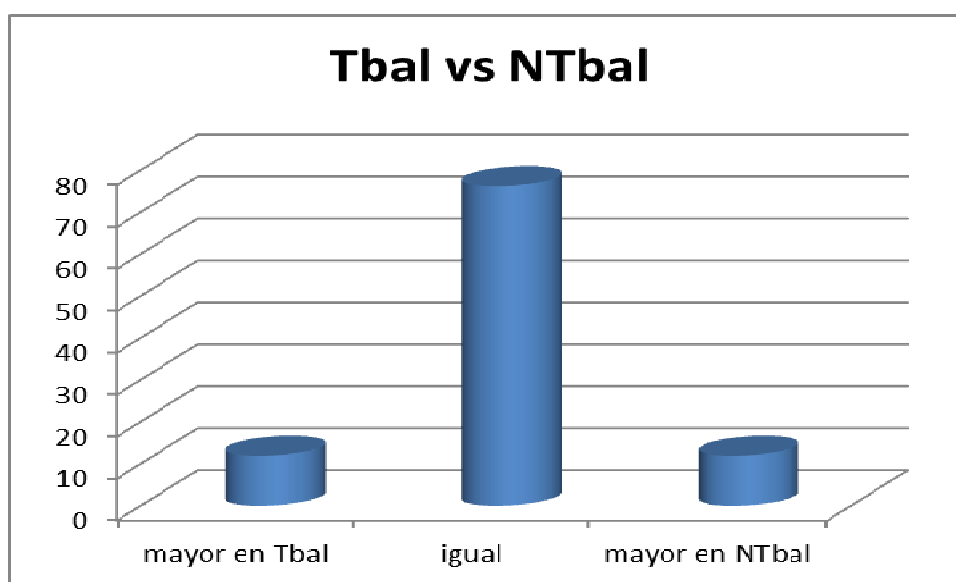


Figura 49: Representación gráfica del porcentaje de los miRNAs identificados expresados de la misma manera independientemente si es patología tumoral o no tumoral en muestras de LBA

Por tanto, se puede afirmar que existe una diferencia entre los niveles de miRNA detectados en plasma y LBA en función de la patología que presente el paciente. Estos resultados sugieren que los miARNs liberados al plasma son diferentes que los miARNs liberados al LBA independientemente de la patología que presente el paciente, y probablemente tengan diferentes funciones y efectos en la comunicación intercelular. Un porcentaje importante de miARNs eran comunes en las muestras de LBA tanto de pacientes oncológicos como no, sin embargo, no encontramos tanta similitud respecto de los miARNs de los exosomas detectados en plasma independiente de si el paciente es oncológico o no. Esto podría explicarse por una liberación selectiva de exosomas desde el tumor al plasma pero no al LBA.

12.5. Análisis de las funciones afectadas por los miARNs desregulados contenidos en los exosomas aislados en los distintos subgrupos analizados

Se realizó un estudio *in silico* para conocer las vías de señalización celular y otras funciones afectadas por los miARNs que se detectaron sobreexpresados en las distintas muestras cuando eran comparadas entre si. Para ello se utilizó la herramienta informática DIANA-mirPath que permite un análisis minucioso de los genes diana de estos miARNs, con la intención de explorar los efectos biológicos que la sobreexpresión de estos miARNs desencadenaría en los procesos celulares conocidos.

Se encontraron diferencias en las funciones afectadas por los mismos cuando se compararon:

- Tbal vs Tpl
- NTbal y NTpl
- Tpl y NTpl
- Tbal y NT bl

Las funciones afectadas encontradas se muestran por medio de un heat map o “mapa de calor”. Se trata de una representación gráfica de datos. Los valores individuales son representados en una matriz en forma de colores que en nuestro caso nos informa de las funciones afectadas según el tipo de miARN.

Al realizar este gráfico con nuestros resultados, nos da otra visión gráfica de qué funciones están más afectadas por los miARNs con elevados niveles (4 veces más) detectados en cada subpoblación. En esta representación gráfica, las funciones estadísticamente más afectadas se muestran en color rojo.

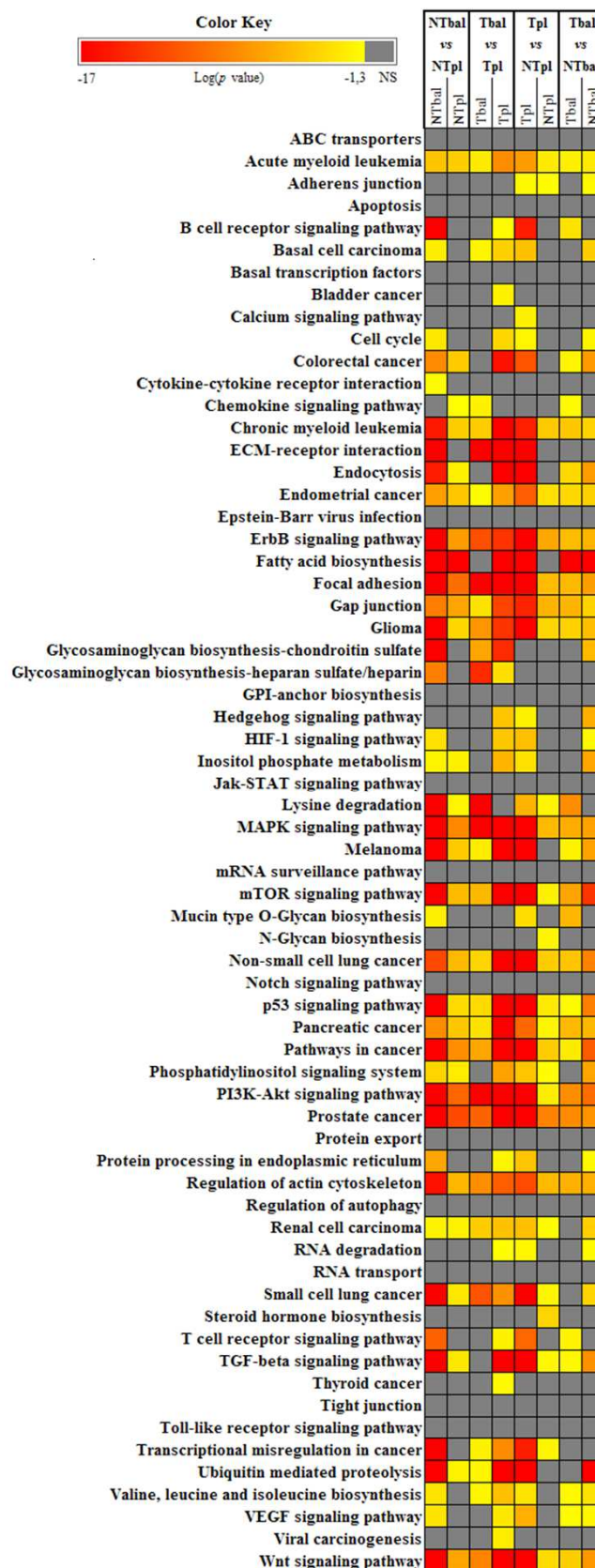


Figura 50: Heat map que muestra las funciones afectadas por los miARNs sobreexpresados (4 veces). Las columnas muestran las diferentes comparaciones entre las muestras analizadas: NT bal vs NT pl, T bal vs Tpl, T pl vs NT pl y Tbal vs NT bal.

Cuando se analiza el tipo de muestra en pacientes sin patología tumoral, existe un mayor número de funciones que son afectadas por los miARNs detectados en los exosomas aislados de LBA que por los detectados en plasma. Funciones sobre todo relacionadas con las vías de señalización celular, MPK, p53, de adhesión y endocitosis.

Sin embargo, esto cambia cuando es analizada la población de pacientes con CP. Así, se observa que los miARNs detectados en exosomas aislados de plasma modifican más funciones que los detectados en LBA. Estas funciones están relacionadas principalmente con procesos de tumorigénesis, adhesión celular, ciclo celular, y funciones relacionadas con el cáncer de pulmón.

En la gráfica también se observa claramente un mayor número de funciones afectadas por los miARNs detectados en exosomas de plasma de pacientes con patología tumoral, comparativamente con las funciones afectadas en el mismo tipo de muestra (plasma) de pacientes sin CP. Las funciones afectadas están en relación con proliferación tumoral, y rutas del cáncer de pulmón.

Por último, cuando las muestras obtenidas de LBA eran analizadas, los resultados que se encontraron en las funciones afectadas y su grado de afectación eran similares en ambas poblaciones (patología no tumoral y tumoral).

Estos resultados están en consistencia con lo mencionado previamente sugiriendo que existen diferencias entre la función de los exosomas aislados de plasma que los del LBA y con la liberación activa de exosomas desde las células tumorales al plasma con carga genética distinta implicada en sus diferentes funciones celulares.

Dos de las rutas afectadas son de especial interés debido a nuestro tipo muestral (cáncer de pulmón): rutas implicadas en el desarrollo y proceso tumoral y CPNM. Los miARNs que están afectando a estas dos rutas se muestran en la siguiente figura:

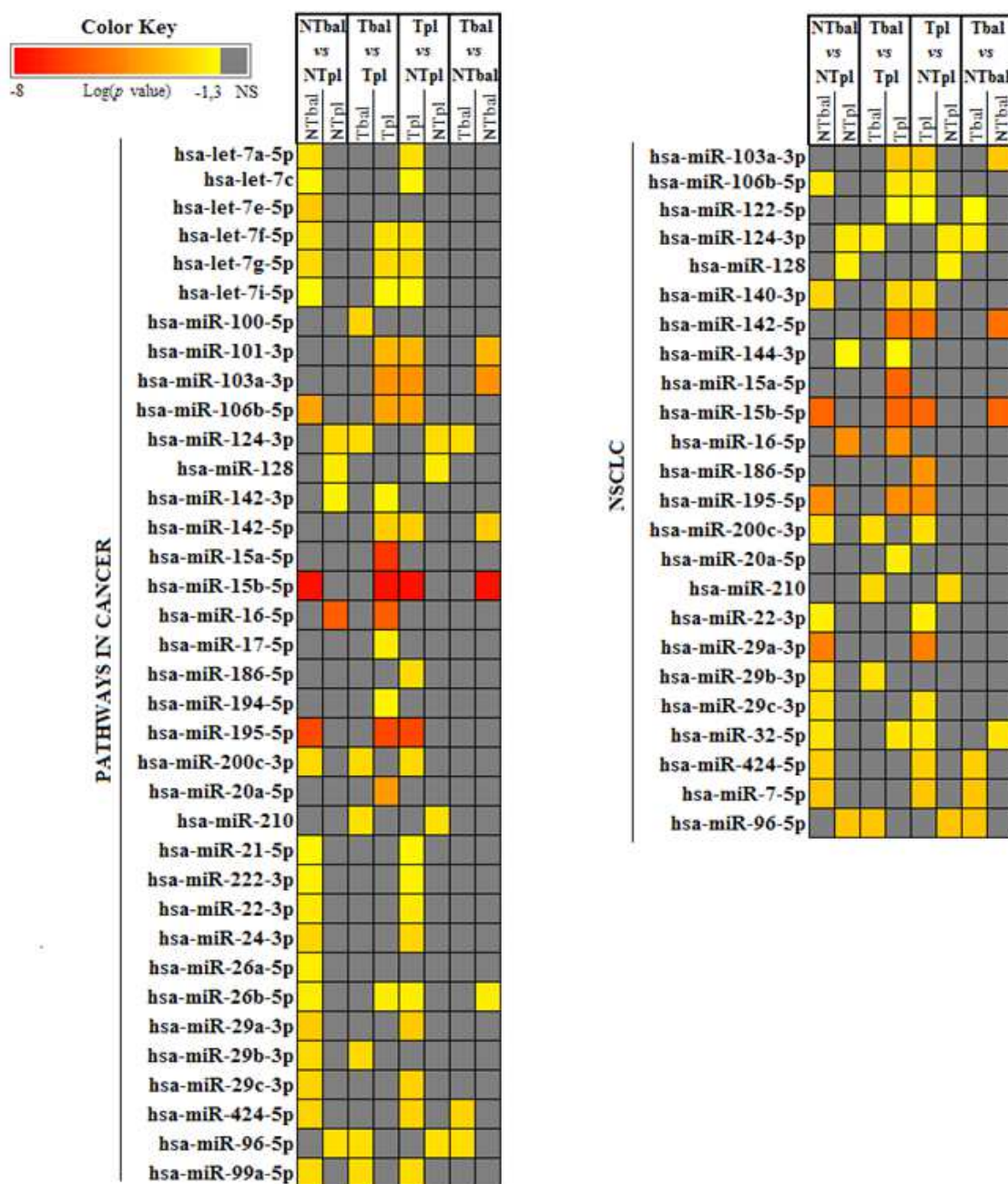


Figura 51: miARNs que afectan a las rutas “pathway in cancer” y CPNM. Se puede observar cómo está de implicado cada miARN en función de los subgrupos comparados. El color representa el valor de p. Más intensidad en rojo mayor significación estadística, en cambio más intensidad en amarillo menor asociación estadística.

13. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS miARNs MÁS DESREGULADOS EN LAS MUESTRAS AGRUPADAS EN UNA SERIE DE VALIDACIÓN

Por último, para tratar de validar todos estos hallazgos sobre los niveles de miRNAs en exosomas, se realizó una validación individual de ciertos miRNAs en una serie de muestras.

Siete miRNAs eran seleccionados para esta validación en base a sus elevados niveles detectados en el estudio anterior: miR-28, miR-29c, miR-141, miR-144, miR146, miR-195 y miR-302c. Se analizaron los niveles de dichos miRNAs en una serie de 30 pacientes con CP y 61 muestras de pacientes sin CP de manera individual mediante un paso inicial de retrotranscripción y la sucesiva cuantificación a tiempo real.

Los resultados de la validación se muestran en la siguiente tabla:

	N	miR-28		miR-29c		miR-141		miR-144		miR-146		miR-195	
		Rango promedio	p	Rango promedio	p	Rango Promedio	p	Rango Promedio	p	Rango Promedio	p	Rango Promedio	p
Pacientes con tumor													
LBA	30	28,15	0,52	30,12	0,77	39,47	<0,01	20,07	<0,01	25,95	0,14	26,15	0,11
Plasma	30	30,95		28,84		18,82		39,61		32,39		33,09	
Pacientes sin tumor													
LBA	61	64,93	0,69	69,16	0,01	87,32	<0,01	37,18	<0,01	58,11	0,36	58,07	0,28
Plasma	61	62,75		53,84		35,68		85,82		63,93		64,93	
Muestras de LBA													
NT	61	48,11	0,27	45,87	0,94	48,60	0,18	48,52	0,13	48,24	0,24	47,16	0,54
T	30	41,70		46,27		40,72		40,87		41,45		43,63	
Muestras de Plasma													
NT	61	46,69	0,36	42,16	0,12	46,76	0,34	50,38	<0,01	43,93	0,97	44,81	0,91
T	30	41,32		51,18		41,16		33,29		44,15		45,41	

Tabla 13: Diferencias estadísticas en los niveles de miARNs detectados en las distintas subpoblaciones de la serie de validación.

En concordancia con los datos del PCR-array de expresión que se realizó en las muestras agrupadas, se pudo confirmar lo siguiente:

- Los niveles detectados de miR-144 eran significativamente mayores en las muestras de plasma que en las muestras de LBA tanto en pacientes sin patología oncológica, como en pacientes con CP.
- El miR-141 presentaba significativamente una mayor expresión en LBA que en las muestras de plasma en ambos tipos de pacientes. Además, cuando se tenía en cuenta sólo las muestras de plasma, se observaban mayores niveles de miR-141 en los pacientes sin patología tumoral que en aquellos con CP.
- El miR-302c fue detectado solo en pocas muestras, por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico. Sin embargo, coincide con los datos obtenidos del PCR-array en que únicamente era detectado en los casos de muestras de LBA.

14. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS EXOSOMAS DE PLASMA Y LBA EN LAS MUESTRAS AGRUPADAS DE PACIENTES CON CP Y EN PACIENTES CON PATOLOGÍA NO TUMORAL

14.1. Análisis de las citoquinas presentes en los exosomas del plasma y LBA en las muestras determinadas

Los niveles de 78 citoquinas fueron analizados mediante un array (Ray Bio® Human Cytokine Antibody Array 5). Todas las citoquinas aisladas fueron detectadas en los 4 subgrupos realizados Tbal, Tpl, NTbal y NTpl. Este análisis muestra que la mayoría de las citoquinas aisladas se detectan en niveles similares en las distintas muestras.

En la siguiente imagen podemos observar los resultados obtenidos de nuestro array de citoquinas tras el análisis de nuestras muestras.

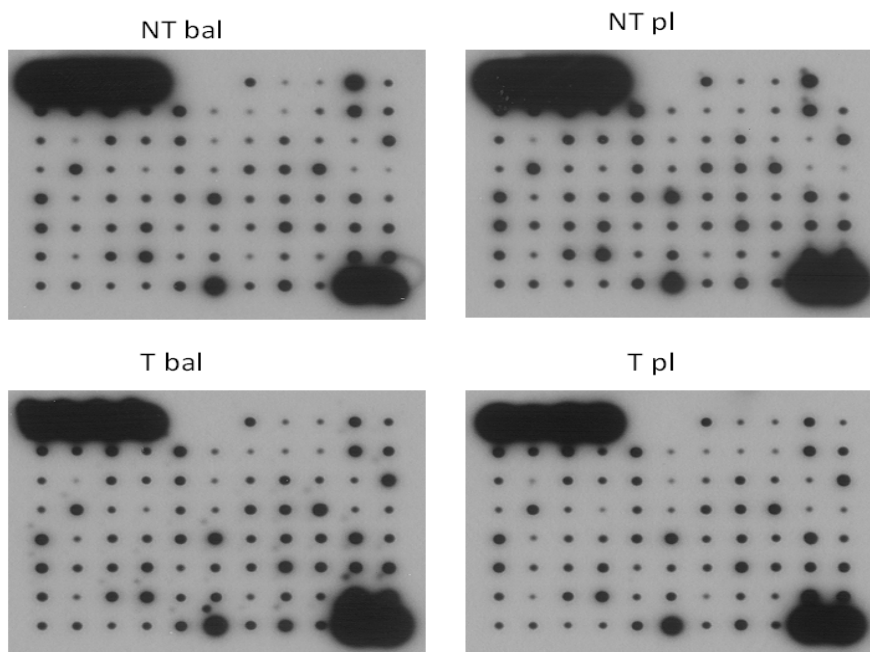


Figura 52: Imagen del array de citoquinas que se obtuvo en las diferentes muestras Tpl, Tbal, NTpl, NTbal.

En la siguiente tabla se presenta las citoquinas más sobreexpresadas en las poblaciones analizadas.

Tpl	Tbl	NTpl	NTbl
TGF- β 2	TGF- β 2	TGF- β 2	TGF- β 2
NAP-2	EGF	GRO	GRO
Exotaxin-2	MIP-1 β	IP-10	IL-8
GDNF	BDNF	BDNF	BDNF
MIP-1 β	TIMP-1	IL-8	IP-10
BDNF	GDNF	GDNF	GDNF
IP-10	Exotaxin-2	RANTES	TIMP-1
EGF	IL-8	TIMP-1	EGF
IL-8	IP-10	MIP-1 β	RANTES
TIMP-1	Oncostatin M	Oncostatin M	Oncostatin M

Tabla 14: Expresión de las citoquinas más expresadas en las diferentes muestras Tpl, Tbal, NTpl, NTbal.

Como se desprende del anterior gráfico, la citoquina más expresada es TGF- β 2, y las comunes en todas las subpoblaciones son TGF- β 2, GDNF y BDNF.

La citoquina NAP-2 es específica de los exosomas aislados del plasma de los pacientes con CP. La citoquina RANTES se encuentra solo expresada en los exosomas del plasma y LBA de pacientes que no presentan patología tumoral.

14.2. Comparación de los niveles de las citoquinas presentes en los exosomas aislados de los distintos tipos de pacientes y tipos de muestras

Los niveles de citoquinas hallados en los exosomas fueron comparados entre las distintas poblaciones.

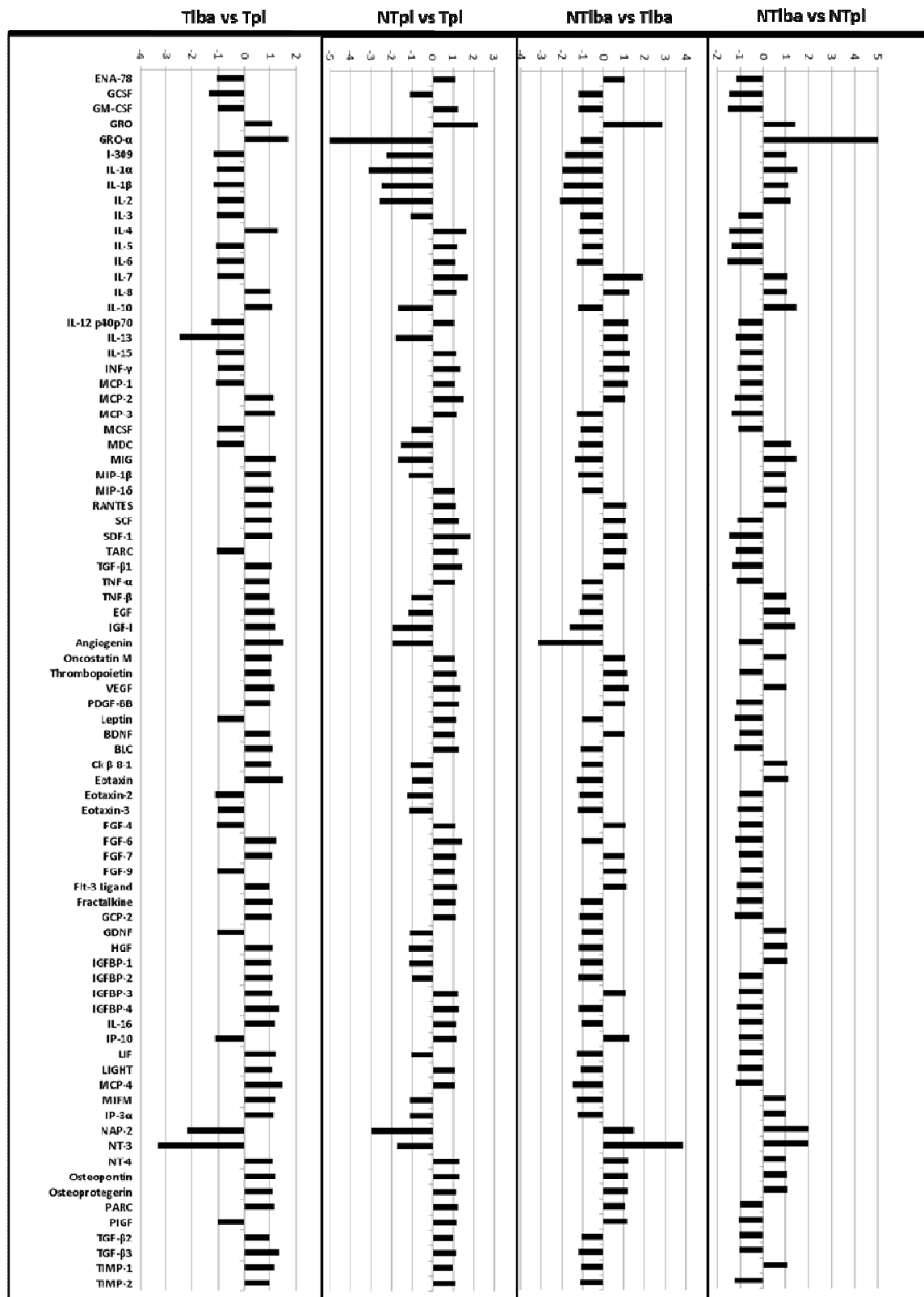


Figura 53: Diferencias entre los niveles de citoquinas individuales cuando comparamos las diferentes muestras Tpl, Tbal, NTpl and NTbal

Se encontraron diferencias (Ratio > 1.75) en las siguientes citoquinas:

- Niveles más elevados de GRO- α en LBA que en plasma en pacientes con patología no tumoral
- Niveles más elevados de IL13 en plasma que en LBA en cáncer de pulmón
- Niveles más elevados de GRO e IL7 y más bajos de angiotensina en LBA de pacientes con patología no tumoral que en pacientes con patología tumoral
- Niveles más elevados de GRO y SDF-1 y más bajos de GRO- α , IGF-1 y angiotensina en plasma de patología no tumoral que en plasma de patología tumoral

Independientemente, las citoquinas estaban expresadas en todas las muestras sin existir claras diferencias entre mayor expresión en unas que en otras

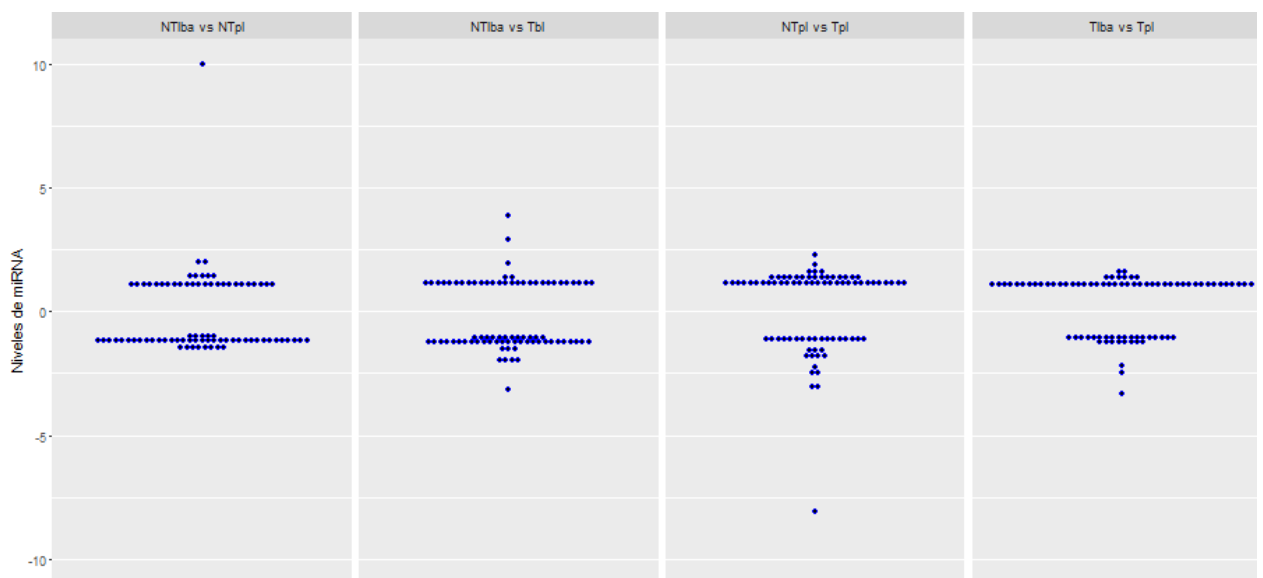


Figura 54: Imagen que recoge las diferencias en los niveles de citoquinas cuando comparamos las diferentes muestras Tpl, Tbal, NTpl and NTbal

15. VALOR PRONÓSTICO DE LOS EXOSOMAS, ASÍ COMO DE LOS NIVELES DE miARNs VALIDADOS EVALUADOS DE MANERA INDIVIDUAL EN LOS EXOSOMAS AISLADOS EN PLASMA Y LBA EN PACIENTES CON CP

Diversos estudios han analizado los ácidos nucleicos circulantes para encontrar marcadores a nivel diagnóstico, pronóstico y de respuesta a tratamiento. En el siguiente estudio se analizó el valor pronóstico de los niveles de exosomas y de varios miARNs contenidos en los mismos en cáncer de pulmón. Se evaluaron tanto los niveles en plasma como en LBA de 30 pacientes. Los miARNs que se analizaron de manera individual son los siguientes: miR-28, miR-29c, miR-141 miR-144, miR146, miR-195 y miR-302c. Sin embargo, para nuestro análisis tomamos en consideración sólo dos miARNs (miR-141 en LBA y plasma y miR-144 en plasma) por ser éstos los que se validaron posteriormente en la serie externa.

Para ello se generó una base de datos conteniendo:

- Datos moleculares del estudio: niveles de exosomas y niveles de cada miARN analizado de manera individual. Los niveles para cada uno de ellos fueron divididos en dos grupos en función del percentil 50: altos niveles (cuando eran mayores del percentil 50) y bajos niveles (cuando eran menores del percentil 50).
- Datos clínico-patológicos de los tumores de los pacientes con cáncer de pulmón en el momento del diagnóstico, los cuales son indicativos de peor pronóstico
- Datos de evolución de la enfermedad y supervivencia global.

15.1. Relación entre los niveles de exosomas y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico

Los resultados del análisis de la relación entre exosomas y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico, por ser variables pronósticas negativas ya conocidas (presencia de invasión vascular y linfática, metástasis o afectación de ganglios linfáticos, grado de diferenciación tumoral y estadio al diagnóstico) se muestran en la siguiente tabla:

Parámetro		N	Niveles de exosomas en plasma		P	Niveles de exosomas en LBA		P
			Bajos	Altos		Bajos	Altos	
Sexo	Masculino	22	12	10	NS	11	11	NS
	Femenino	8	3	5		4	4	
Fumador	No	4	1	3	NS	1	3	NS
	Sí	26	14	12		14	12	
Invasión V/L	Negativa	14	6	8	NS	5	9	NS
	Positiva	16	9	7		10	6	
MGL	Negativa	12	3	9	0,025	7	5	NS
	Positiva	18	12	6		8	10	
DT	Bien	8	4	4	NS	4	4	NS
	Moderado	18	9	9		9	9	
	Pobre	4	2	2		2	2	
Estadio	I	5	2	3	NS	0	5	NS
	II	3	1	2		2	1	
	III	5	4	1		3	2	
	IV	17	8	9		10	7	
Éxito por CP	No	9	5	4	NS	2	7	0,033
	Sí	20	10	10		13	7	

Invasión V/L: Invasión vascular y/o Linfática; MGL: Metástasis en Ganglios Linfáticos; DT: Diferenciación tumoral; NS: no significativo. El valor de p fue calculado con el test de χ^2 . Eran considerados estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05 en contraste a dos colas.

Tabla 15. Relaciones entre los niveles de exosomas en plasma y LBA y los parámetros clinicopatológicos.

Sólo se estableció una correlación estadísticamente significativa entre menores niveles de exosomas aislados del plasma y una mayor presencia de metástasis en ganglios linfáticos ($p=0.025$; χ^2 test). Con respecto a los niveles de exosomas en LBA,

sólo se observó una asociación entre elevados niveles y una menor tasa de éxitos debido al tumor ($p=0.033$).

15.2. Relación entre los niveles de miARNs validados (miR-141 y miR-144) y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico

Los resultados del análisis de la relación entre los miARNs validados en la serie externa (miR-141 y miR-144) y parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico, por ser variables pronósticas negativas ya conocidas (presencia de invasión vascular y linfática, metástasis o afectación de ganglios linfáticos, grado de diferenciación tumoral y estadio al diagnóstico) se muestran en la siguiente tabla:

Parámetro		N	Niveles de miR-141 en plasma		P	Niveles de miR-141 en LBA		P
			Bajos	Altos		Bajos	Altos	
Sexo	Masculino	22	11	11	NS	11	12	NS
	Femenino	8	2	4		3	4	
Fumador	No	2	1	1	NS	0	3	0,044
	Sí	26	12	14		14	13	
Invasión V/L	Negativa	12	4	8	NS	4	9	NS
	Positiva	16	9	7		10	7	
MGL	Negativa	12	6	6	NS	7	7	NS
	Positiva	16	7	9		9	9	
DT	Bien	8	4	4	NS	4	5	NS
	Moderado	16	8	8		8	9	
	Pobre	4	1	3		2	2	
Estadio	I	5	2	3	NS	1	5	NS
	II	3	0	3		3	0	
	III	5	3	2		2	3	
	IV	15	8	7		8	8	
Éxitos por CP	No	9	4	5	NS	4	6	NS
	Sí	19	9	10		10	9	

Invasión V/L: Invasión vascular y/o Linfática; MGL: Metástasis en Ganglios Linfáticos; DT: Diferenciación tumoral; NS: no significativo El valor de p fue calculado con el test de χ^2 . Eran considerados estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05 en contraste a dos colas.

Tabla 16. Relaciones entre los niveles de miR-141 en plasma y LBA y los parámetros clinicopatológicos.

Parámetro		N	Niveles de miR-144 en plasma		P
			Bajos	Altos	
Sexo	Masculino	22	10	12	NS
	Femenino	6	4	2	
Fumador	No	2	2	0	NS
	Sí	26	12	14	
Invasión V/L	Negativa	12	9	3	0,022
	Positiva	16	5	11	
MGL	Negativa	12	7	5	NS
	Positiva	16	7	9	
DT	Bien	8	6	2	0,050
	Moderado	16	8	8	
	Pobre	4	0	4	
Estadio	I	5	2	3	NS
	II	4	2	1	
	III	5	2	3	
	IV	15	8	7	
Éxitus por CP	No	9	4	5	NS
	Sí	19	10	9	

Invasión V/L: Invasión vascular y/o Linfática; MGL: Metástasis en Ganglios Linfáticos; DT: Diferenciación tumoral; NS: no significativo El valor de p fue calculado con el test de χ^2 . Eran considerados estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05 en contrastes a dos colas.

Tabla 17. Relaciones entre los niveles de miR-144 en plasma y los parámetros clinicopatológicos.

No se observó ninguna asociación significativa entre los niveles de miR-141 detectados en plasma y los parámetros analizados. Sí se encontró una asociación entre altos niveles de miR-141 en LBA y pacientes no fumadores ($p=0.044$). Con respecto a los niveles de miR-144 en plasma, elevados niveles se asociaban con una pobre diferenciación del tumor, así como con invasión vascular y/o linfática ($p=0.022$).

15.3. Asociación entre los niveles de exosomas y la supervivencia de los pacientes

Se realizó la clasificación de los pacientes en base al percentil 50 de sus niveles de exosomas, tanto en plasma como en LBA. La media de seguimiento fue de

29.7 meses (rango de seguimiento de los pacientes: 2-66 meses). Durante este período, el 62.5% de los pacientes de la muestra falleció a causa de la enfermedad neoplásica de base.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la SG cuando eran comparados pacientes con niveles altos y bajos de exosomas en plasma ($p=0.996$; método de Kaplan-Meier).

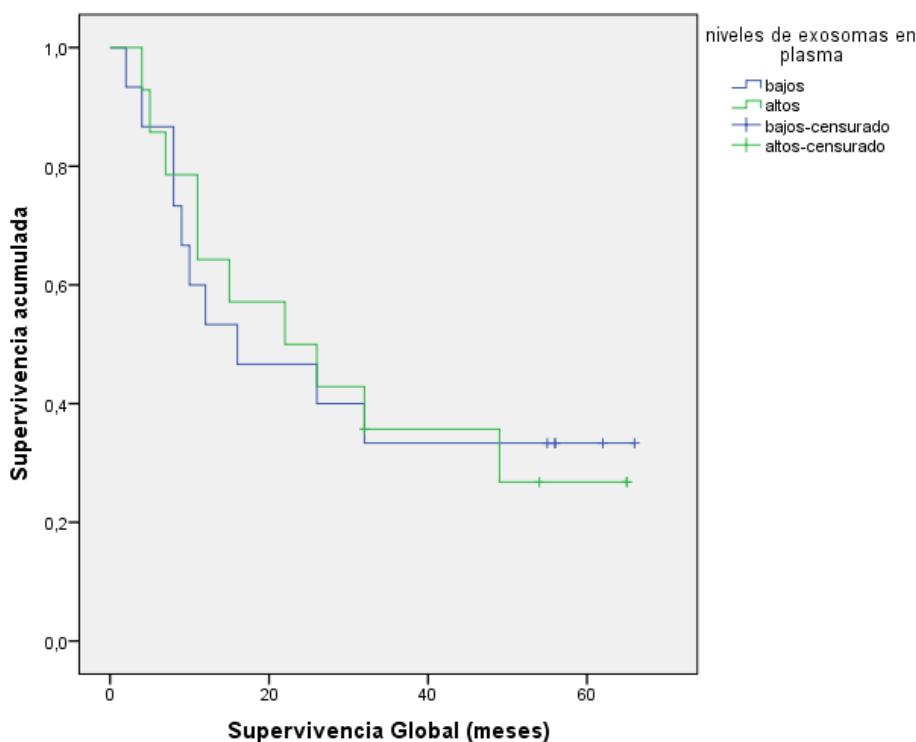


Figura 55: Curvas de Kaplan Meir de la relación entre los niveles de exosomas en plasma y SG.

Con respecto a la SG en función de los exosomas aislados de LBA no se observó una diferencia significativa ($p=0.108$), aunque podría ser debido al bajo número de casos analizados ya que se observa una clara separación de las curvas. Así, a los 60 meses de seguimiento, la SG de los pacientes fue del 13.3% (95% IC, 0-31%) en aquellos con bajos niveles de exosomas en LBA, y del 50% (95% IC, 24-76%) en los pacientes con altos niveles de exosomas en LBA.

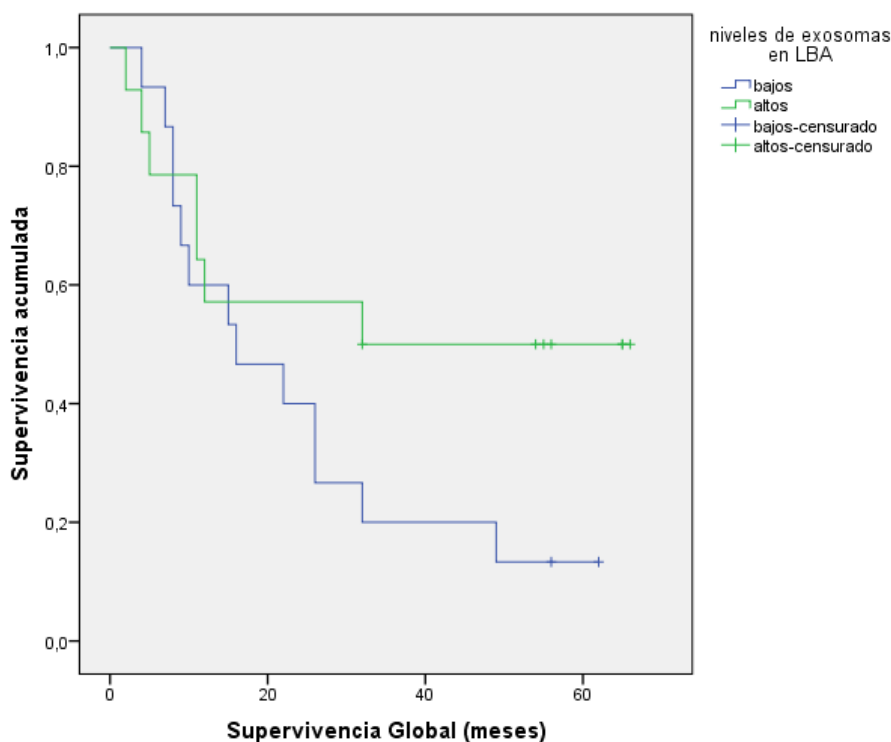


Figura 56: Curvas de Kaplan- Meier de la relación entre los niveles de exosomas en LBA y SG de los pacientes

15.4. Asociación entre los niveles de miRNAs validados y supervivencia de los pacientes

Se realizó la clasificación de los pacientes en base al percentil 50 de sus niveles de miR-141, tanto en plasma como en LBA. Tal y como se comentaba en el apartado anterior, la media de seguimiento de la población fue de 29.7 meses (rango de seguimiento de los pacientes: 2-66 meses). Durante este período, el 62.5% de los pacientes de la muestra falleció a causa de su CP.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la SG cuando eran comparados pacientes con niveles altos y bajos de miR-141 tanto en plasma ($p=0.644$; método de Kaplan-Meier) como en LBA ($p=0.313$; método de Kaplan-Meier).

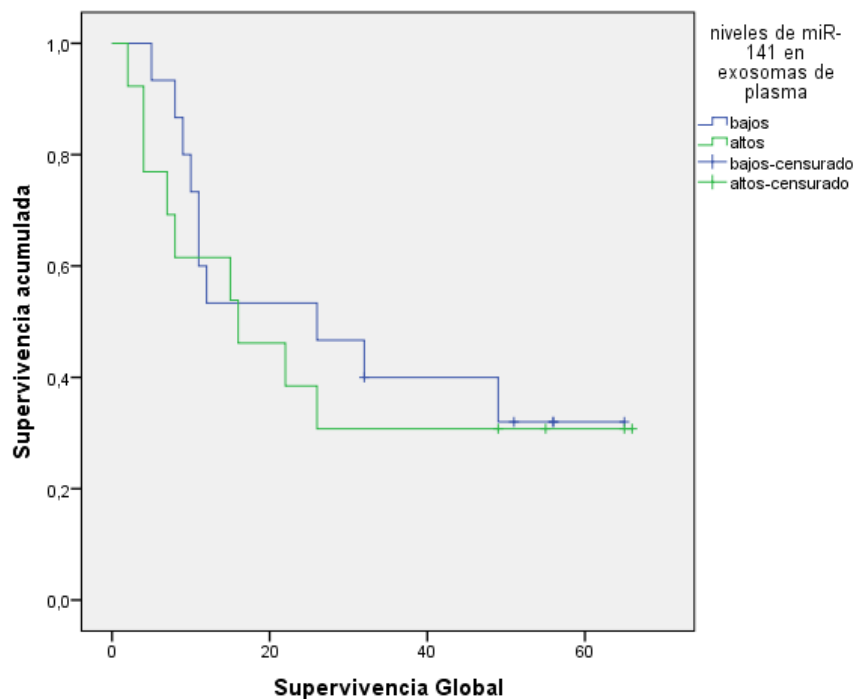


Figura 57: Curvas de Kaplan-Meier de la relación entre los niveles de miR-141 en los exosomas plasmáticos y la SG de los pacientes del estudio.

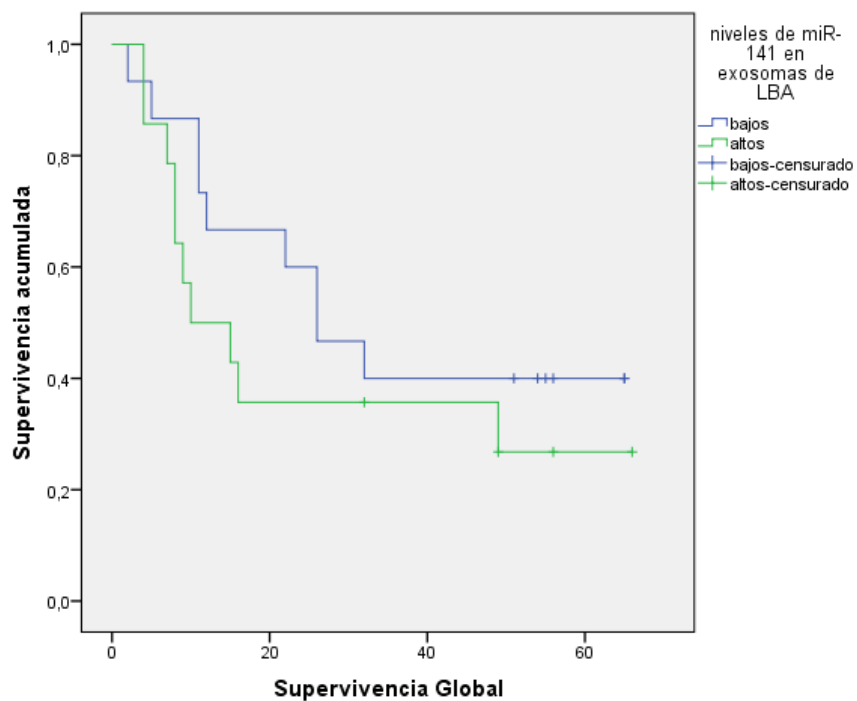


Figura 58: Curvas de Kaplan-Meier de la relación entre los niveles de miR-141 en los exosomas de LBA y la SG de los pacientes del estudio.

Con respecto a la SG en función de los niveles de miR-144 en plasma, no se observó una diferencia significativa ($p=0.982$).

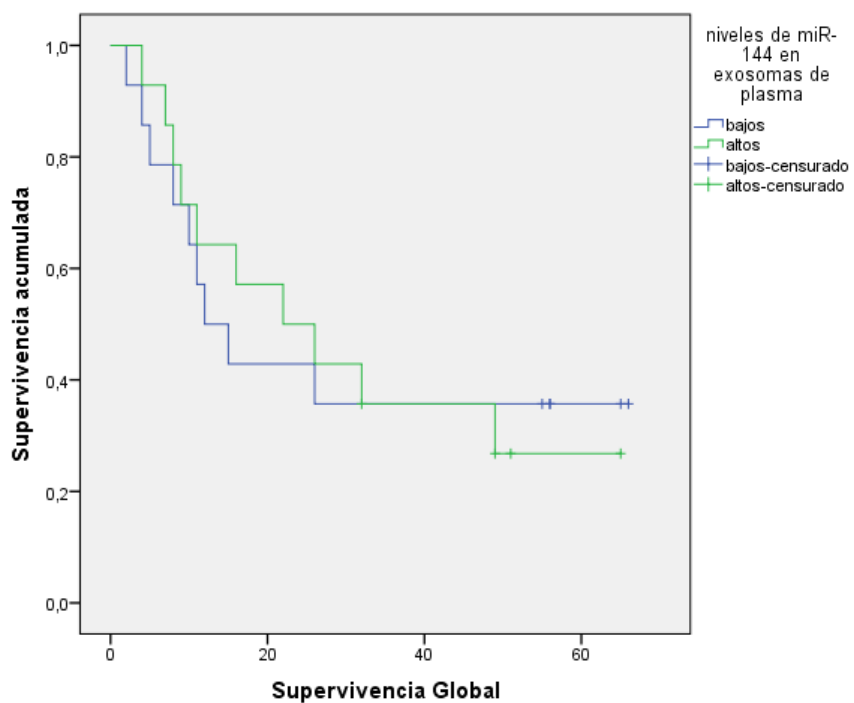


Figura 59: Curvas de Kaplan-Meier de la relación entre los niveles de miR-144 en los exosomas de plasma y la SG de los pacientes del estudio.

DISCUSIÓN

Actualmente sabemos que las neoplasias de pulmón son la causa más frecuente de muerte por cáncer a nivel mundial, causando aproximadamente 1.2 millones de muertes al año entre hombres y mujeres [19]. En los Estados Unidos se estima que se diagnosticaron unos 220.000 nuevos casos de CP y se contabilizaron 160.000 muertes en el año 2009 [7]. En España la importancia de este problema no queda mucho más atrás. Se estima que el CP fue el responsable de unos 18.500 casos nuevos al año de CP y el responsable de 17.308 muertes en el año 2000. La escasa diferencia entre el número de casos prevalentes e incidentes refleja la alta letalidad de este tumor.

Por tanto el CP sigue siendo un problema de salud pública que necesita de un empeño sin pausa para conseguir avanzar en el conocimiento de los mecanismos que faciliten su entendimiento y de este modo poder mejorar las cifras de supervivencia.

Esta es la razón que nos animó a realizar un proyecto centrado en CP que pudiera suponer un avance, tratando de esta manera de realizar nuestra aportación científica en la lucha contra esta gravísima enfermedad.

Sabemos que cerca del 90% de los pacientes permanecen asintomáticos en el momento del diagnóstico del CP, la idea de poder mejorar la manera de avanzar en un diagnóstico precoz a nivel molecular en CP fue también un objetivo en este proyecto. La posibilidad de identificar material tumoral con técnicas diagnósticas sencillas, como la FBC, supondría un avance en lo que se refiere al diagnóstico precoz del CP.

LA FBC es una técnica muy sensible para el diagnóstico definitivo del CP, nos permite obtener biopsias cuya rentabilidad es muy alta [210]. Gracias a ella, podemos obtener LBA que es de alta sensibilidad para el diagnóstico patológico y a su vez, el análisis del LBA nos permite obtener material pulmonar del paciente sobre el que poder realizar análisis moleculares [211, 212]. Este hecho

nos permitió poder trabajar con este material biológico con el fin de obtener muestra tumoral molecular presente en este medio. Nuestro proyecto pretendía obtener material genético extracelular del LBA en pacientes con CP y sin patología oncológica.

Existen antecedentes en la literatura descritos previamente sobre la factibilidad de encontrar material genético en LBA, sin embargo la manera de aislarlo para poder posteriormente analizarlo no está tan estudiado, así como la posibilidad de aislarlo en pacientes con CP. En este sentido, el trabajo publicado por Admyre C. [167], en el que pone de manifiesto por primera vez la presencia y aislamiento con éxito de exosomas en el LBA de personas sanas, centró nuestro interés en considerar la posibilidad de aislar exosomas del LBA de pacientes con CP, siendo este uno de los objetivos, como se ha comentado, de nuestro estudio. De esta manera pretendíamos posteriormente analizar y cuantificar los mismos y cómo método de validación de una herramienta diagnóstica de utilidad clínica en el contexto de esta patología.

Nuestro proyecto describe por primera vez, en la fecha de realización, un modo adecuado y reproducible de obtener material genético aislado en LBA de pacientes con CP. Además, realizamos una comparación de nuestros hallazgos con pacientes que presentaban patologías pulmonares no tumorales, para de este modo poder encontrar resultados que nos permitieran poder mejorar el conocimiento de la enfermedad.

Estas patologías no tumorales fueron enfermedades pulmonares para las que fue indicada una FBC diagnóstica y poder así llegar a su diagnóstico definitivo. La mayoría correspondían a enfermedades pulmonares intersticiales, pero existían enfermedades infecciosas, sarcoidosis, tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasis y patología pleural. Se realizó un análisis en todos estos pacientes del material genético que existía en el LBA y en el plasma para poder posteriormente compararlo con el encontrado en el LBA y

el plasma de pacientes con CP y estudiar cómo se encuentra ese material genético y su implicación en CP.

La presencia de ácidos nucleicos extracelulares en el plasma de pacientes oncológicos es un hecho ampliamente demostrado, y se han aportado similitudes de estos con el tumor primario, lo que implica que se pueda utilizar el plasma como una fuente subrogada de este material genético [97, 94]. Se ha puesto de manifiesto en estudios previos que existe una relación pronóstica entre su presencia en plasma y la posterior evolución clínica de los pacientes [100, 107].

La presencia de estos ácidos nucleicos extracelulares en otros fluidos también ha sido descrita por diferentes grupos. Se ha descrito su presencia en fluidos biológicos como orina, leche materna, semen, líquido amniótico, líquido broncoalveolar, saliva...etc. [115, 213, 214]. Lo que no se había realizado con anterioridad es detectar su presencia en LBA de pacientes con CP.

En relación con los mecanismos de liberación de ácidos nucleicos de las células tumorales al torrente sanguíneo y sus formas de presentación en plasma u otros fluidos existen menos evidencias. Se ha descrito que los ácidos nucleicos extracelulares de pacientes con cáncer, al menos en parte, circulan protegidos en estructuras similares a microvesículas [129]. En fisiología celular la liberación de microvesículas proporciona un mecanismo de comunicación intercelular, y su composición depende fundamentalmente del tipo de fuente celular, del estado de activación de las células productoras de las microvesículas, y de la vía por la que se generan [215, 141].

Los exosomas son pequeñas vesículas de 40 a 100 nm liberadas por exocitosis de la superficie de la célula ante diferentes estímulos. Son microvesículas intraluminales que se diferencian principalmente por su tamaño y por su carga molecular específica [184]. Están constituidas por diferentes proteínas y

moléculas específicas, implicadas en su biología, estructura y función, relacionadas la mayor parte de ellas con la función biológica de la célula de origen. Pese a ello, la composición molecular de cada exosoma puede ser diferente incluso si proceden de la misma célula [216].

Por otra parte, actualmente se sabe que los exosomas liberados a los medios de cultivo *in vitro* en algunos experimentos de animales, transfieren información de su contenido de manera eficiente a otros tipos de células y causan diferentes efectos en la respuesta inmune, la división celular, la angiogénesis y en algunos pasos de las metástasis [217, 218]. Sin embargo, todavía no está claro cómo el contenido de exosomas que proceden de células tumorales está influenciando otros muchos procesos implicados en la carcinogénesis [219].

Muchos estudios han descrito cómo estos exosomas se pueden transferir entre las células, ya sea por contacto directo célula-célula o a través de la secreción de vesículas, en parte procesadas en la membrana [220]. El intercambio de proteínas de membrana entre células del sistema inmune, fue descrito por primera vez hace 30 años en estudios sobre celularidad de médula ósea, donde se observó que los timocitos donantes podían adquirir moléculas del sistema de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) [221]. Las consecuencias funcionales de la transferencia de este material de membrana de una célula a otra célula receptora pueden modificar la inducción, la amplificación, y/o modulación de la respuesta inmune, así como otras nuevas propiedades funcionales como son la capacidad de motilidad y migración, y modificación de la tasa de proliferación [122].

La capacidad de comunicación entre las células implica la existencia de mediadores intercelulares como la secreción de proteínas solubles que se unen a los receptores de las células vecinas, o la liberación de nanovesículas de membrana que se unen a la membrana de las células diana mediante receptores específicos. También ha sido publicado que entre el contenido de las

microvesículas se encuentran ARNm y microARNs, lo que plantea la posibilidad de transferencia de material genético a otras células receptoras [169, 145]. Así pues, si la intercomunicación celular es un proceso frecuente y capaz de modular funciones celulares, y que para su desarrollo son necesarios mecanismos moleculares que conecten entre sí a las células, es posible que la célula tumoral y no tumoral utilicen el intercambio de microvesículas como vía para llevar a cabo esta intercomunicación [220, 150].

Ya que la mayoría de estos estudios en este campo se han llevado a cabo en experimentos *in vitro* con nanovesículas purificadas a partir de los medios de cultivos celulares y en menor frecuencia con las extraídas de fluidos corporales [223, 224] nosotros hemos analizado la secreción de exosomas, un tipo específico de microvesículas, en el plasma y por vez primera en el LBA de una serie de pacientes con CP y sin patología tumoral pulmonar, tratando de observar algunas de sus características y lo hemos tratado de relacionar con la evolución de la enfermedad.

Posteriormente se compararon los hallazgos con la cantidad de exosomas circulantes extraídos del plasma y LBA de un grupo de pacientes con patología pulmonar no oncológica, tratando de ver sus diferencias y la posible explicación de estos hechos.

16. CONSIDERACIONES SOBRE LOS EXOSOMAS AISLADOS DEL PLASMA Y LBA DE PACIENTES CON CP Y SIN PATOLOGÍA TUMORAL

En el presente trabajo conseguimos aislar por vez primera exosomas del LBA en pacientes con CP. Como se ha comentado anteriormente, existen algunos estudios que demuestran la existencia de exosomas en el LBA de pacientes, fundamentalmente en aquellos con patologías inmunológicas [211, 225, 176, 226, 227]. Por vez primera con nuestro estudio hemos conseguido aislarlos del LBA de pacientes con CP. A su vez, también se aislaron del LBA y del plasma de pacientes con patologías pulmonares no oncológicas.

Para la extracción de exosomas de LBA fue necesaria la puesta a punto de un método nuevo de aislamiento en este medio, que nos permitió objetivar su presencia en el mismo. Para el aislamiento de exosomas en plasma se utilizaron los métodos descritos previamente en la literatura sobre el tema.

Una vez aislados, con el procedimiento detallado previamente en el apartado de Material y Métodos, los exosomas fueron cuantificados por el método de la acetilcolinesterasa y con la tecnología NanoSight, para determinar de esta manera la concentración de los mismos en el plasma y el LBA de los pacientes del estudio [228, 229, 230].

Encontramos que los exosomas estaban presentes en todas las muestras estudiadas (pacientes con CP y sin patología oncológica, tanto en plasma como LBA), pero al realizar un análisis comparativo, encontramos que existía una mayor concentración de los mismos en el plasma de ambos grupos con respecto al LBA de los mismos enfermos.

La presencia de exosomas en plasma, como ya se ha comentado, ya era conocida [231, 232], sin embargo su presencia en el LBA de pacientes con CP no

había sido descrita. De este modo por primera vez se demuestra que están presentes en pacientes oncológicos y que su detección es factible. Esta aportación de nuestro estudio supone un hallazgo novedoso en el conocimiento más profundo de la biología del CP. Esta nueva información aportada, sugiere que el tumor puede utilizar también una vía local, no sistémica, para desarrollar determinadas funciones mediante este material genético vehiculado en los exosomas [150].

La presencia de los mismos en plasma, está en consonancia con diversos estudios previos [167, 129, 215, 141, 184], donde ya se demostraba la presencia de exosomas en plasma de forma habitual, como también se ha evidenciado en este estudio. El hecho de que en pacientes oncológicos presenten niveles más elevados de exosomas en plasma, hecho ya demostrado sobre el comportamiento de los tumores [142, 201, 233, 234], es un mecanismo que podemos asumir como lógico, y que le permite al tumor poder desarrollar una serie de acciones efectoras en otras regiones distantes del organismo. Sabemos, además, que los exosomas desarrollan importantes funciones biológicas, y que es a través del plasma como consiguen alcanzar sus objetivos y realizar estas acciones como procesos de coordinación y su colaboración en la homeostasis celular y control de procesos fisiológicos [184, 235, 236, 237].

Obtuvimos una mayor concentración de exosomas tanto en las muestras de LBA como de plasma en el subgrupo de pacientes con patología oncológica que en aquellos sin CP. Este hecho es interesante y refuerza los estudios previos donde se describe un mayor número de estas nanovesículas en el plasma de pacientes con patologías oncológicas [150, 231], observándose, también, que con frecuencia estas vesículas contienen elevados niveles de miARNs específicos, lo que podría indicar que su presencia en plasma estaría relacionada con la diseminación tumoral, como se ha publicado previamente [234, 235]. Por tanto, es una hipótesis cada vez más extendida que estas vesículas extracelulares

jueguen un papel crucial en la transferencia de información en procesos oncológicos y en nuestro estudio en concreto con el desarrollo tumoral del CP.

Una vez aislados, conseguimos visualizarlos mediante Microscópica Electrónica de Trasmisión y Microscopía Confocal. Las imágenes que obtuvimos son similares a la morfología que está descrita en la literatura para estas nanovesículas [141, 184, 216]. Las imágenes visualizadas mostraban su morfología y contorno, así como su tamaño alrededor de 100 nm, concordante con el tamaño descrito para los exosoma en trabajos previos, entre 40 -100nm. [236, 237]. Por tanto fuimos capaces de visualizar exosomas en plasma y LBA de ambas poblaciones, con un tamaño consistente y similar en los 4 subgrupos analizados, alcanzando de esta manera uno de los objetivos propuestos.

En nuestro estudio también realizamos una caracterización de estas nanovesículas mediante una inmunotransferencia de las mismas, tanto las aisladas de plasma como de LBA, con la finalidad de detectar marcadores específicos de superficie exosomal y de esta manera garantizar que estábamos trabajando con exosomas. Están descritos una gran variedad de marcadores comunes de la superficie exosomal: tetraspaninas tales como CD9 y CD63 y proteínas asociadas a dominios ricos en lípidos como flotilina-1 [168, 238].

Encontramos la presencia de estos marcadores específicos de membrana exosomal (CD63, CD9 y flotilina) en todas las muestras de plasma de los pacientes para ambos grupos de ellos. También objetivamos la presencia de estas proteínas en las muestras de las vesículas extraídas del LBA de todos los pacientes por vez primera en la literatura [239]. Se encontró menor expresión de estas proteínas de la membrana exosomal en las muestras de LBA que en las de plasma, hecho concordante con el análisis cuantitativo realizado previamente, demostrando mediante otro procedimiento que existía una menor cantidad de exosomas en muestras de LBA que en el plasma para ambos grupos de pacientes.

Concluimos que existe una mayor presencia de material exosómico en las muestras de plasma tanto de pacientes con cáncer como con patología pulmonar no oncológica, así como la existencia de este mismo material exosómico en el LBA de ambos tipos de pacientes. Estos hechos están probablemente relacionados, como se ha comentado previamente, con la mayor presencia en plasma de exosomas en condiciones normales, ya que sabemos que esta es la vía más utilizada para su circulación y el desarrollo de sus funciones efectoras celulares. Sabemos que representan un importante modo de comunicación intercelular, a través de la transferencia de información genética y no genética, y sirven de vehículos para la transferencia a través de la membrana celular, de proteínas citosólicas, de lípidos y de ARN. Todas estas funciones las realizan fundamentalmente al haber sido vehiculizadas a través del plasma sanguíneo, para de esta manera poder realizar su papel fundamental en la regulación de la fisiología celular normal y en los procesos patológicos.

La presencia de los exosomas en LBA abre varias vías futuras de investigación, sobre las funciones que desempeñen en esta localización intrapulmonar de la vía aérea, y, que, hipotéticamente, pudieran estar relacionadas con procesos de crecimiento e invasión local del tumor, así como de cancerización de campo [240, 241]. El hecho de que en nuestro trabajo no encontramos una diferencia significativa en la cantidad de exosomas en este medio entre pacientes oncológicos y pacientes sin patología no tumoral, pudiera ser debido probablemente a el escaso número de pacientes incluídos, al diseño del estudio o escaso tamaño muestral, pero es probable que este medio pudiera ofrecer en el futuro una nueva opción para encontrar biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en CP [38, 242], con la ventaja de tratarse de un método poco invasivo para la obtención de este material. Más allá de la información que los exosomas pueden ofrecer en el terreno del diagnóstico y/o pronóstico, estos también abren posibilidades futuras para vehicular de forma selectiva terapias antitumorales [243].

17. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE miARNs CONTENIDOS EN LOS EXOSOMAS

Los microARNs (miARNs) son unas pequeñas moléculas de ARN endógenos que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica [244]. Juegan un papel regulador muy importante en la especie humana ya que al unirse a los ARNm son capaces de inhibir la traducción a proteínas [245]. Forman parte de las clases más abundantes de moléculas reguladoras génicas, influenciando en los niveles de expresión finales de muchos genes que codifican para proteínas. Un miARN puede tener muchos ARNm diana y cada ARNm puede estar regulado por varios miARNs. En estudios bioinformáticos se ha estimado que los miARN pueden regular hasta el 30% de todos los genes humanos [246].

Los miARNs se unen por apareamiento imperfecto a sus ARNm generalmente en la región 3' bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del ARNm y represión trasduccional.

El primer miARN descrito fue lin-4 que regula los diferentes estadios en el desarrollo de la larva *C. elegans* descrito por Victor Ambros y cols. [247, 248]. Estos autores demostraron que lin-4, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína, pero en cambio producía dos ARNs pequeños. El pequeño ARN lin-4 fue reconocido como el miembro fundador de una clase muy abundante de pequeños ARNs reguladores llamados microARNs o miARNs. Desde entonces un gran número han sido identificados en el genoma de varias especies incluyendo al humano. El número de miARNs sigue incrementándose debido a los esfuerzos combinados de la biología molecular y la predicción bioinformática. Según un recuento en mirBase en Febrero 2007 había más de 500 miARNs maduros registrados y se han ido descubriendo sus dianas y funciones [249, 250].

Existen numerosos estudios donde se demuestra que la expresión de los miARNs se encuentra alterada en cáncer, de manera que la sobreexpresión o la regulación negativa de estas moléculas se asocian de forma específica con el desarrollo de distintos tipos de neoplasias [251, 252, 126].

La importancia de los miARNs en cáncer se debe al descubrimiento de que la mayoría de los miARNs humanos se encuentran localizados en regiones genómicas que segregan como muchos tipos de cánceres y hay una evidencia creciente que sugiere que la expresión anormal de miARNs es característica común de los procesos neoplásicos. Se ha sugerido por diversos estudios [251, 253, 254] que los patrones de expresión de miARNs pueden distinguir distintos tipos de cáncer, por una firma específica asociada a un diagnóstico y también respecto al estadio en que se encuentren, de forma más específica que los estudios tradicionales de expresión génica.

Lu y col. [255], demostraron que los patrones de expresión global de miARNs pueden clasificar los tumores de una forma mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión de ARNm.

Los miARNs juegan un papel directo en el control del desarrollo tumoral, pudiendo actuar estos como oncogenes o como genes supresores de tumores. La expresión aberrante de estos miARNs se ha asociado a muchos tipos de cáncer, incluyendo tumores sólidos y hematopoyéticos. Los mecanismos moleculares por los que los miARNs llegan a controlar los procesos de carcinogénesis no están aclarados en la actualidad en la mayoría de los casos.

Parece evidente que a medida que aumenta nuestro conocimiento sobre la biología de este mecanismo de regulación génica, mejorarán nuestras posibilidades para utilizar los miARN como marcadores de diagnóstico, pronóstico y de respuesta a fármacos.

Con el avance de las técnicas de biología molecular actualmente es posible determinar simultáneamente los niveles de expresión de la totalidad de los miARNs descritos hasta la fecha. Entre las técnicas disponibles se encuentra la RT-PCR, descrita ampliamente en el apartado Material y Métodos de este trabajo, y utilizada por nosotros en este proyecto, permite la cuantificación desde un solo miARN hasta 384, en nuestro caso utilizamos una plataforma que permitía la cuantificación de 84 miARNs simultáneamente. Estos métodos permiten identificar miARNs conocidos.

Todo lo expuesto anteriormente hizo posible que realizáramos un análisis del material genético incluido en los exosomas hallados en nuestras muestras con la finalidad de conocer su implicación en patologías como el CP.

El proceso de extracción del mismo se realizó mediante procedimientos ya descritos en la literatura y kits comerciales siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante. De este modo pudimos analizar el contenido de miARNs presentes en las distintas muestras de cada subpoblación, analizando la presencia y niveles de 84 miARNs simultáneamente.

Los resultados que obtuvimos mostraron que la concentración de miARNs era significativamente mayor en las muestras de pacientes con cáncer, tanto en plasma como en LBA. Este hecho, unido a la mayor proporción de exosomas detectados en el plasma de pacientes con CP, apoya la hipótesis de que los tumores pueden adquirir una ventaja proliferativa y de esta manera proliferar e invadir mediante la liberación de exosomas al plasma. Es razonable pensar que la información contenida en su carga molecular pudiera ser un reflejo de las características biológicas de cada tumor.

Encontramos también un número no desdeñable de miARNs comunes en las cuatro subpoblaciones estudiadas. Este hecho pone de manifiesto la cantidad de

miARNs que realizan funciones comunes celulares, independientemente de si existe enfermedad, funciones claves en la fisiología celular. Son miARNs no específicos que encontramos tanto en plasma como en LBA y tanto en pacientes con CP como sin patología tumoral. Probablemente estemos delante de miARNs con funciones reguladoras comunes e importantes en el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

El hecho de que obtuviéramos un mayor número de miARNs en las muestras de pacientes con cáncer es significativo. Dada la importancia manifiesta del papel de los miARNs en cáncer, debida a los hallazgos publicados sobre su implicación en esta patología en los últimos años [251, 252, 126], nuestro estudio también es consistente con ellos. Nuestros hallazgos son compatibles con la evidencia de que la expresión anormal de estos miARNs es clave en procesos neoplásicos al encontrar un mayor número de ellos en las muestras de pacientes neoplásicos.

Cuando se analizaron los distintos subgrupos, según el tipo de pacientes (tumoral y no tumoral) y el tipo de muestra (plasma y LBA), se detectaron miARNs específicos. Los miARNs encontrados específicos en cada subgrupo se detallan a continuación:

Se detectó el **miR-122** de manera específica en las muestras de pacientes con tumor, no detectándose en las muestras de población libre de tumor, lo cual ponía de manifiesto que probablemente se tratara de un miARN con funciones específicas tumorales. El grupo de Zhen-Ya y col. [256] relaciona la presencia de miR-122 con vías de propagación tumoral en hepatocarcinoma fundamentalmente, encontrando niveles reducidos de miR-122 en HCC comparado con hígado normal. Los bajos niveles del mismo se asociaban con mal pronóstico, en cambio su sobreexpresión reduce el grado de malignidad del tumor, sugiriendo de esta manera su papel como miARN con actividad supresora tumoral [256, 257].

Por otro lado encontramos que el miR-126 y miR-144 fueron detectados solo en exosomas extraídos de muestras de plasma, no detectándose en muestras de LBA.

La expresión de **miR-126** se encuentra principalmente en las células endoteliales, tanto en los capilares sanguíneos como en otros vasos de la circulación general, realizando de esta manera su función principal en el control de la angiogénesis.

Ha sido asociado tanto con actividad supresora tumoral, como con actividad oncogénica dependiendo del tipo de tumor donde se localizaba. El hecho de que sólo lo encontráramos en muestras de plasma está acorde con su función principalmente en la regulación de la angiogénesis, así como su presencia en pacientes independientemente de la patología que presenten, dado que la angiogénesis es un proceso fisiológico en organismos eucariotas [257, 258].

El trabajo publicado por Sun y col. [259], demuestra la actividad de miR-126 como supresor tumoral inhibiendo la proliferación tumoral en líneas de CP a través del gen EGFL7. El miR-126 maduro se une a la secuencia complementaria de EGFL7 inhibiendo la traducción de la proteína y reduciendo los niveles de proteína de EGFL7. Esta proteína estaría implicada en la migración celular y formación de neovasos convirtiendo al miR-126 en un elemento clave necesario para la formación de vasos tumorales que aportarán posteriormente los nutrientes necesarios a las células tumorales para su crecimiento e invasión. Nuestros datos indican que el tumor elimina miR-126 mediante liberación exosomal.

La expresión de **miR-144** ha sido relacionada con las vías de diseminación tumoral en cáncer colorectal y carcinoma renal. Los estudios publicados por Wang y col. [260] lo relacionan con la vía tumoral regulada por mTOR, poniendo de manifiesto que su desregulación está implicado en la

proliferación tumoral del cáncer de colon. El trabajo publicado por Guo y col. [261], lo relaciona como mediador de la proliferación tumoral en cáncer renal a través de la vía Wnt- β catenina.

Los miARNs más representados en los exosomas aislados de LBA en ambos tipos de enfermos, son los que mayor similitud presentan. En nuestros resultados cabe resaltar la existencia de otros dos miARNs, el miR-302a y miR-302c, esta vez específicos de muestras de LBA.

Tanto **miR-302a** y **miR-302c** solo han podido ser detectados en células madre embrionarias y no en células madre adultas, por lo que se sospecha que son específicos de células madre embrionarias [262]. Se postula que estos miARNs son funcionales durante la etapa de desarrollo embrionario, pero son desactivados más tarde durante el desarrollo posterior, lo que sugiere que su actividad y expresión se encuentran restringidas a las células en proceso de embriogénesis [263]. Probablemente estos miARNs tengan un papel importante en la embriogénesis pulmonar. Todo el epitelio pulmonar es generado a partir de un pequeño conjunto de células progenitoras indiferenciadas que, durante las fases tempranas del desarrollo, se encuentran en puntos distales de los conductos del pulmón embrionario. Estas células progenitoras responden a múltiples señales emitidas desde el mesénquima circundante las cuales juegan un papel clave en la morfogénesis del aparato respiratorio [264, 265].

No existen datos en la literatura que justifiquen el hecho de la presencia de miARNs embrionarios en células maduras adultas, una posible justificación tendría que basarse en la posibilidad de que durante el desarrollo embrionario pulmonar queden quiescentes para posibles acciones futuras en el epitelio pulmonar y ello justifica que solo los hayamos encontrado en muestras de LBA. Es muy probable además que estos miARNs no tengan ninguna relación con funciones de desarrollo tumoral.

En muestras de LBA en pacientes con patología oncológica encontramos de manera específica el **miR-143**. Este miARN parece estar relacionado con el desarrollo coronario y con vías de diseminación tumoral [266, 267, 268]. Su sobreexpresión ha sido observada en el proceso de metastasis en el carcinoma hepatocelular mediante la represión del gen FNDC38. Su expresión se ha encontrado en todas las etapas tumorales incluidas las muy precoces del proceso. Se ha observado en otros trabajos [269, 270] que posee también una función como supresor tumoral en muestras de cáncer colorrectal.

El **miR-128** fue encontrado en muestras de plasma de pacientes con patologías pulmonares diferentes a las oncológicas. Este miARN ha sido relacionado fundamentalmente con los procesos de desarrollo y maduración del sistema nervioso [271]. Está abundantemente representado en la región del hipocampo fetal y en los adultos diagnosticados de enfermedad de Alzheimer [272]. Ha sido por tanto demostrado que el miR-128 juega un papel crucial en el desarrollo cerebral y en el mantenimiento de funciones fisiológicas normales [273, 274]. Recientemente ha sido demostrado que su expresión anormal puede verse expresada no solo en tejidos normales sino también en la sangre de pacientes con enfermedades malignas [275]. El hecho de que no encontrásemos su presencia en pacientes con CP podría deberse a que su papel principal es la maduración y desarrollo de órganos fetales, así como el mantenimiento de funciones fisiológicas normales, fundamentalmente del sistema nervioso.

Ningún miARN fue hallado de manera específica en las muestras de LBA de pacientes sin patología oncológica. Este hecho podría estar en consistencia con las cada vez mayores evidencias de que la función principal de los miARNs tenga relación con el proceso de diseminación tumoral [59, 250, 276]. Los resultados de nuestro trabajo están en consistencia con estos hechos.

En resumen, nuestros hallazgos demuestran una mayor cantidad de miARNs contenidos en los exosomas de muestras plasmáticas que en las muestras de

LBA. Asimismo encontramos mayor cantidad de ellos en muestras de pacientes con CP. Existen miARNs específicos que tienen estrecha relación con funciones relacionadas con el desarrollo de patologías malignas como el CP. Esto indicaría que el tumor utiliza la sangre como la principal vía de diseminación de material genético, verosímilmente, con el objetivo de establecer efectos a distancia.

Encontramos además que existen miARNs contenidos en exosomas aislados de muestras de LBA, estando la mayoría de ellos relacionados con procesos de desarrollo embrionario y organogénesis.

17.1. Consideraciones sobre los miARNs con mayor expresión en las distintas poblaciones definidas

Se identificaron los 10 miARNs con mayor expresión encontrados en cada uno de los cuatro subgrupos (según tipo de paciente y según tipo de muestra). A continuación se realizó un análisis comparando los niveles de los 84 miRNAs analizados en los distintos subgrupos.

Se encontraron diferencias entre los miARNs aislados de exosomas de muestras plasmáticas y de aquellos extraídos de los exosomas del LBA, lo que podría indicar que los exosomas liberados al plasma tendrían funciones diferentes que aquellos liberados a la vía aérea.

A pesar de ello, encontramos también en menor número, miARNs comunes en los cuatro subgrupos que pone de manifiesto el hecho de que existen miARNs que regulan funciones celulares generales, como son el let-7b y miR-92a [277, 278].

En pacientes oncológicos encontramos más miARNs con alta expresión en muestras de plasma que en LBA. Por el contrario, en pacientes sin patología oncológica tumoral encontramos una más alta expresión de miARNs en el LBA

que en las muestras de plasma. Estos hallazgos indican que el material genético tumoral está principalmente disperso por la circulación plasmática en vez de por el espacio aéreo o espacio alveolar, más propio de otros procesos no tumorales como el asma o patologías inmunológicas [64, 261].

El hecho de que existan más miARNs expresados en el plasma de pacientes con CP que el plasma de pacientes sin patología oncológica soporta el hecho de que los miARNs preferentemente son liberados al plasma por los tumores. En el caso de las muestras de LBA, un porcentaje importante de miARNs eran comunes entre las dos poblaciones.

Se realizó posteriormente un análisis de las funciones afectadas por los miARNs desregulados de los exosomas aislados de los distintos subgrupos y estas a su vez fueron comparadas entre sí en función del tipo de muestra (Plasma *vs* LBA) y tipo de patologías (CP *vs* CMP). Para ello se utilizó, como se comenta en el apartado de Material y Métodos, una herramienta informática denominada DIANA mirPath v2.0 [279] que permite un análisis minucioso de los genes dianas de estos miRNAs y las múltiples vías celulares que se pueden ver afectadas por la desregulación de estos miARNs.

En pacientes tumorales, se identificaron varias vías relacionadas todas ellas con el desarrollo tumoral, incluido el CP. Estos hallazgos sugieren un rol primordial en cáncer para varios de los miARNs analizados y encontrados en nuestro trabajo [82, 83, 84, 85, 92].

Cuando comparamos el número de miARNs relacionados de forma significativa con las vías de cáncer y específicamente con CP, existen claras diferencias en el número de miARNs que están involucrados en una misma vía, en función del tipo de patología y del tipo de muestra.

Nuestros resultados sugieren que los miARNs aislados de los exosomas plasmáticos de pacientes con CP contienen más miARNs relacionados con vías y procesos tumorales en contrapartida con los aislados del LBA de pacientes con CP y del plasma y LBA de pacientes sin tumor. El número de miARNs implicados en estas rutas era menor en aquellos aislados del LBA en ambos grupos de pacientes.

Estos hallazgos indican que la capacidad funcional de los exosomas depende del tipo de muestra y del tipo de paciente. Existen datos clínicos publicados en este sentido que avalan estos hecho [38, 280]. En pacientes con CP los miARNs liberados al plasma pueden identificar subgrupos de pacientes con diferente comportamiento biológico de sus tumores.

18. CONSIDERACIONES SOBRE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE miRNAs CONTENIDOS EN LOS EXOSOMAS DE LA SERIE DE VALIDACIÓN

Para tratar de contrastar todos estos hallazgos sobre los niveles de miARNs contenidos en los exosomas, se realizó una validación individual de ciertos miARNs en una serie de muestras externas.

Se seleccionaron siete miARNs en base a los elevados niveles encontrados de los mismos: miR-28, miR-29c, miR-141, miR-144, miR-146, miR-95 y miR-302c. Se analizaron los niveles de dichos miRNAs en una serie de 30 pacientes con CP y 61 muestras de pacientes sin CP de manera individual.

Los resultados mostraron que los niveles de **miR-144** eran significativamente mayores en las muestras de plasma que en las muestras de LBA independientemente de la patología presente. Sabemos que miR-144 forma parte de firmas de miARNs tumorales y que ha sido implicado en la proliferación e invasión de células tumorales [281]. Debido a ello, es probable que su presencia sea por tanto fundamental en el plasma y no en otro medio. Este miARN tiene funciones importantes tanto en la activación de vías tumorales como un papel supresor tumoral y tal como hacíamos referencia previamente, es un miRNA implicado en las vías de diseminación tumoral fundamentalmente en cáncer colorectal y carcinoma renal [75, 76] por lo que sería lógico que se exprese en pacientes con patología tumoral, correspondiéndose con los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo.

El **miR-141** presentaba mayor expresión en LBA de forma significativa comparativamente con las muestras de plasma en ambos tipos de pacientes. Si teníamos en cuenta solo las muestras plasmáticas, se observaban mayores niveles de miR-141 en los pacientes sin patología tumoral. Estudios previos [282] describen en cambio, niveles de miR-141 más altos en plasma de pacientes

con CP que en plasma de pacientes con patologías benignas, y a su vez se correlacionan con los niveles de activador de plasminógeno de uroquinasa. El miR-141 pertenece a una familia de miARNs relacionada con la regulación de la transición epitelio mesénquima [283], este proceso está relacionado a su vez con el desarrollo embrionario y con la invasión y progresión tumoral [284]. Existen trabajos que demuestran que la alta expresión de miR-141 en plasma está relacionado con un peor pronóstico en pacientes con CP [285].

El miR-302c fue detectado en pocas muestras y no se pudo realizar un análisis con suficiente poder estadístico. Sin embargo, coincide con los datos obtenidos en los perfiles de expresión de miRNAs realizado en la serie total del trabajo en que únicamente era detectado en los exosomas de muestras de LBA. miR-302c está relacionado con el mantenimiento de la proliferación celular de las células madres embrionarias y se ha visto recientemente implicado en la reprogramación celular [30].

19. CONSIDERACIONES SOBRE PERFILES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS CONTENIDOS EN LOS EXOSOMAS

Originariamente se estableció el término “linfocina” para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta a un antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más amplio de “citoquina”.

El término “interleucina” se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían. No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformador de tejidos) [286].

Las citoquinas son un grupo amplio de proteínas secretadas por ciertas poblaciones celulares que ejercen sus funciones sobre otras dianas celulares, uniéndose para ello a otros receptores específicos localizados en membranas celulares. Son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 kDa.

En general, poseen una vida media corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros muy variados tipos celulares que se encuentran en su vecindad. En algunas ocasiones, pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática ejerciendo su efecto en otros órganos o tejidos [287].

Esta unión facilita el desencadenamiento de una serie de señales al interior celular, consiguiendo así la activación de factores transcripcionales que

permitirán posteriormente la expresión de proteínas codificadas en el genoma celular [286, 288].

De esta manera las citoquinas actúan también como reguladoras de funciones celulares, tanto activadoras como inhibidoras, motivo por el cual se ven implicadas en importantes funciones fisiológicas de la célula como respuesta inmune, activación celular, etc.

Las citoquinas poseen capacidad de modular la actividad funcional de células individuales y tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Su importancia es crucial para que las respuestas inmunitarias, innata y adquirida, se desarrollen con normalidad, y también pueden controlar otros procesos celulares de vital importancia en la fisiología celular como apoptosis, mitosis, diferenciación, migración, supervivencia celular y transformación maligna. El interés por conocer la posible implicación de las citoquinas vehiculadas en los exosomas en CP, motivó el análisis realizado en este estudio.

Se sabe además que hay una relación estrecha entre la malignización celular y el sistema inmune, y uno de sus principales protagonistas son las citoquinas. Los estudios de Burnet demostraron que el sistema inmune juega un papel de vigilancia dirigido a defender al individuo de la diferenciación de células neoplásicas [288]. Esto se conoce como teoría de inmunovigilancia y postula que las células tumorales expresan antígenos que no están presentes en las células normales y que hacen que la célula tumoral sea reconocida por el sistema inmune como extraña y por consiguiente destruida.

La tecnología de microarrays representa una plataforma de gran versatilidad para el análisis a gran escala de moléculas de distinto origen. Así, no solo se han descrito arrays de ácidos nucleicos sino también se han ido desarrollando con tejidos, células, proteínas y anticuerpos entre otros. Los arrays de proteínas y, en nuestro caso concreto de citoquinas, se han aplicado al estudio de perfiles

proteicos de extractos de tejidos, líneas celulares y fluidos biológicos para detectar simultáneamente múltiples antígenos basándonos en su unión a los anticuerpos.

Para determinar la selección de citoquinas incluidas en nuestros exosomas utilizamos un proceso descrito con anterioridad en el trabajo mediante el kit comercial RayBio Human Cytokine Antibody Array 5 Map.

Se detectaron citoquinas en todos los subgrupos que analizamos. La presencia de citoquinas incluidas en los exosomas de nuestros subgrupos, independientemente de si se trataba de pacientes oncológicos o no, o si eran muestras de plasma o LBA, nos revela la importancia de estas proteínas en el organismo y su ubicuidad, debido fundamentalmente a sus funciones relacionadas con la inmunidad celular, y otras funciones importantes para la estabilidad celular.

La citoquina más sobreexpresada en las poblaciones que analizamos fue el factor activador de tejidos (**TGF2 α**). TGF α ejerce una potente acción inmunoinhibidora y de supresión de la respuesta inmune inducida por el tumor [289, 290]. Entendemos que el hecho de estar tan representada en nuestras muestras sea debido a su función clave en programas relacionados con la respuesta inmune celular. Esta citoquina ha sido estudiada como potencial biomarcador pronóstico en varios tumores sólidos, como el carcinoma de estómago y melanoma [291].

Así mismo estaban presentes en todas las subpoblaciones las citoquinas Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDFN) y Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDFN). El BDFN y GDFN son citoquinas abundantes y ampliamente distribuidas en el sistema nervioso principalmente [292]. Muchos estímulos del organismo aumentan la expresión de estas citoquinas. La liberación de BDNF se asocia con un incremento de la actividad glutamatérgica [293].

Encontramos una citoquina específica solo para exosomas plasmáticos de pacientes oncológicos que fue **NAP-2**. La proteína activadora de neutrófilos NAP-2 deriva de células epiteliales y es activadora de neutrófilos, por ello probablemente esté más expresada en exosomas plasmáticos. Asimismo, lo que parece es que en pacientes tumorales estaría más activada la respuesta inmune como respuesta antitumoral del organismo [294]. Los neutrófilos son constituyentes importantes en el infiltrado celular de los tumores y pueden afectar al crecimiento tumoral por varias vías, todo ello en conjunto justificaría su presencia específica solo en plasma de pacientes oncológicos.

La citoquina **RANTES** sólo fue expresada en exosomas de pacientes que no presentaban patología tumoral. La función principal de RANTES es inducir la migración de monocitos y otros tipos celulares como células natural-killer o células dendríticas. La citoquina RANTES atrae células, como son células T, eosinófilos y basófilos que expresan el receptor CCR5 [295]. Dadas sus funciones muy generales dentro de la inmunidad celular es normal que sea más expresada en exosomas de pacientes no tumorales como encontramos en nuestros resultados.

Se realizó a continuación un análisis comparativo entre los niveles de expresión de las citoquinas contenidas en los exosomas hallados según tipo de paciente y tipo de muestra.

En pacientes sin patología oncológica, se encontraron niveles más elevados de **GRO- α** en muestras de LBA que en muestras plasmáticas. El complejo de citoquinas GRO- α , GRO- β y GRO- γ forman un conjunto que derivan fundamentalmente de células epiteliales y tienen un papel importante como activadoras de neutrófilos, actividad muy universal y por ello es compatible con los hallazgos encontrados, elevadas en pacientes sin patología oncológica y en el LBA [296]. Su elevada expresión en LBA de pacientes con patologías

pulmonares no tumorales, podría ser debido a su presencia en relación con componentes inflamatorios propios de enfermedades puramente pulmonares como los pacientes seleccionados en nuestro estudio.

En pacientes afectos de CP, se encontraron niveles más elevados de **IL-13** en muestras de plasma que de LBA. La IL-13 es producida por linfocitos T activadores, compartiendo muchas de sus funciones con la IL-4 con la que se encuentra genéticamente relacionada. Es un citoquina con actividad inmunopresora y que inhibe, junto con la IL-4 y la IL-10 la producción de citoquinas inflamatorias por los monocitos [297]. Por otra parte, esta citoquina incrementa la expresión de CD23 y promueve el cambio de clase de inmunoglobulina hacia la producción de IgE [298]. Dadas sus funciones es entendible su expresión de forma más elevada en plasma sanguíneo y en pacientes con enfermedad tumoral como muestran nuestros hallazgos.

En las muestras de LBA se encontraron niveles más elevados de **GRO e IL-7** en pacientes sin patología oncológica, que en pacientes con CP. La IL-7 es producida por células estromales. Promueve la maduración de linfocitos inmaduros a linfocitos B y de linfocitos T inmaduros en el timo fetal y adulto. Estimula la producción de IgG en células B maduras. Su elevada presencia en muestras de LBA podría tener que ver con un papel prioritario en relación con la inmunidad local, altamente activada en procesos patológicos pulmonares, como los representados en nuestro estudio [299].

En las muestras plasmáticas se encontraron niveles más elevados de **GRO y SDF-1** en pacientes no oncológicos. Independientemente, las citoquinas estaban expresadas en ambas poblaciones sin existir claras diferencias entre mayor expresión en una que en otra.

Por tanto, el hecho de que los exosomas aislados sean portadores de moléculas tan importantes en la inmunidad, confieren a los mismos capacidades

funcionales para producir cambios cruciales en la respuesta inmune antitumoral, ejerciendo efectos negativos sobre la célula presentadora de antígeno y sobre los linfocitos T. En este campo de la interferencia de la inmunología antitumoral por exosomas, también se han descrito funciones mediadas por citoquinas que sugieren que los exosomas pueden actuar como un vehículo que transfiere señales supresoras con efectos negativos sobre la respuesta inmune antitumoral [300, 301].

20. CONSIDERACIONES SOBRE LA RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXOSOMAS Y MIARNs Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PEOR PRONÓSTICO, ASÍ COMO SU RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

En relación con los datos obtenidos en nuestros pacientes con CP, la presencia de niveles altos o bajos de exosomas circulantes en plasma y/o LBA de los pacientes, no demostró una diferencia estadísticamente significativa con la supervivencia global, y no se relacionó tampoco con parámetros indicativos de peor pronóstico.

En nuestros pacientes con CP, tampoco se encontró una asociación significativa entre los niveles de determinados miARNs aislados del plasma y/o LBA con el pronóstico y supervivencia de los pacientes.

No pudimos determinar si esta falta de significación podría estar relacionada con el escaso tamaño muestral o si realmente no existía relación entre dichas variables. No existen datos en la literatura donde podamos comparar y validar los nuestros, ya que no hay estudios publicados en que se analice la presencia de exosomas en plasma y LBA en pacientes con CP y su relación con la SG. Tampoco encontramos en la literatura la posible relación de los niveles de miARNs analizados en plasma y LBA con el pronóstico del CP.

21. PERSPECTIVAS FUTURAS

La dificultad del diagnóstico certero y precoz de una enfermedad tan prevalente y agresiva como el CP conduce a la búsqueda de alternativas que puedan ser utilizadas como herramientas de apoyo a las técnicas diagnósticas habituales.

Los miARNs han sido objeto de numerosos estudios desde que se descubrieron evidencias de que podrían ser utilizados como biomarcadores diagnósticos en diferentes tipos de tumores [131]. Los resultados de nuestro estudio son prometedores, no obstante, sería necesario la validación independiente de los datos reportados en series amplias de pacientes. La mayoría de los estudios actuales se encuentran en etapas iniciales con respecto al objetivo final que es el uso rutinario en la práctica clínica. El potencial que presentan los miARNs en diagnóstico es enorme y ofrece además una herramienta de apoyo al método habitual de diagnóstico en CP. Todo ello justifica los esfuerzos de evaluación y validación de los miARNs como biomarcadores diagnósticos y pronósticos. En nuestro caso, es también un dato que favorece su traslado a la clínica, que el procedimiento no sea invasivo.

La información pronóstica que nos ofrecería la determinación de exosomas circulantes en pacientes tumorales, si admitimos las funciones y capacidades comentadas previamente, podría estar relacionada con un incremento de la capacidad metastásica de los tumores, informando de esta manera sobre la biología del tumor y la evolución del mismo, y poder contribuir a diseñar estrategias terapéuticas mas apropiadas para cada enfermo.

En esta misma línea, el hecho de que se haya descrito una desregulación de la expresión de los miARNs en muchos tipos de cáncer, sugiere que la actuación sobre los miARNs puede abrir puertas hacia una nueva terapia. Si el defecto molecular primario en el desarrollo de una determinada neoplasia está en los

miARNs o en sus diferentes vías efectoras, se podría intervenir para normalizar o corregir la expresión de los mismos. Este tipo de aproximación está todavía en fase muy inicial, pero con el desarrollo futuro de nuevas tecnologías, de nuevos algoritmos y con el avance que se está produciendo en el campo de la regulación génica, podría llegar a ser una herramienta terapéutica plausible en el tratamiento de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer.

La transmisión de información genética con capacidad de inducir determinados efectos en células diana, puede tener otras consecuencias si tenemos en cuenta las posibles dianas receptoras de esa información. Así, las células madre pluripotenciales podrían tener un tipo de respuesta proliferativa clonal con resultados imprevisibles en el campo de la oncogénesis [302].

Esta forma de intercomunicación celular mediada por nanovesículas podría estar también en la base de otras enfermedades como Parkinson, Alzheimer o enfermedades por priones, de las cuales desconocemos hasta la fecha su etiopatogenia [214].

Si el papel inmunomodulador, entre otros, de los exosomas liberados por células tumorales fuese constatado definitivamente *in vivo*, la posibilidad de diseñar agentes basados en bloquear esta liberación, podría teóricamente representar una estrategia potencial para restaurar la inmunidad tumoral y contribuir al control de la diseminación y progresión tumoral. Así mismo existe un creciente interés en el estudio de exosomas como un mecanismo ideal para el desarrollo de vacunas contra enfermedades tumorales buscando la obtención de respuesta inmune celular y humoral. Se ha demostrado que nanopartículas sintéticas podrían ser conjugadas con vesículas de tipo exosomal para utilizarlas como sistema de suministro de una vacuna eficaz. La inmunoterapia exosomal se basa en gran medida en el sistema inmunitario, y con la información disponible en la actualidad en este campo queda mucho trabajo

aún por hacer para garantizar un uso terapéutico seguro y eficaz de los exosomas [303, 304, 305].

Para concluir, y como se describe en este trabajo, los exosomas son importantes entidades moleculares implicadas en la comunicación intercelular y por ende en la fisiopatología y desarrollo de enfermedades tumorales. Los exosomas tienen un gran potencial como biomarcadores diagnósticos y probablemente también pronósticos en cáncer. Se perfilan como una nueva modalidad terapéutica prometedora en la lucha de una enfermedad tan importante como el cáncer.

A modo de resumen, nuestro trabajo es el primer estudio que compara la concentración de exosomas aislados del plasma y LBA simultáneamente así como su material genético en pacientes con y sin enfermedad oncológica. Los niveles de exosomas fueron significativamente más elevados en plasma que en el LBA en ambos grupos de pacientes. En pacientes con enfermedad neoplásica el número de miARNs fue más elevado en los exosomas aislados del plasma que en el LBA. Las diferencias en la expresión de miARNs en plasma en las distintas poblaciones analizadas es significativa, esto hace suponer que la carga molecular de los exosomas es específica de cada uno y está relacionado con funciones celulares específicas. En las muestras de LBA las diferencias encontradas no son tan llamativas, esto puede ser debido al escaso número de pacientes incluidos en nuestro trabajo. Probablemente se necesiten nuevos estudios que aporten más datos y confirmen los resultados obtenidos por nuestro grupo. En cualquier caso, los datos obtenidos abren nuevas vías futuras de investigación básica en CP.

Aunque los datos que presentamos son fundamentalmente descriptivos, nos plantean cuestiones importantes y aún desconocidas sobre la liberación y diseminación del material genético. También estos datos apuntan a una implicación de los exosomas liberados por las células del tumor hacia funciones más directamente relacionadas con la diseminación y propagación tumoral.

CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido hacer reproducible un método de extracción de exosomas de LBA, y se ha demostrado su existencia por primera vez en este medio en pacientes con cáncer de pulmón.
2. Se aislaron exosomas en muestras de plasma y de LBA de pacientes con cáncer de pulmón y de pacientes con patologías pulmonares no oncológicas, como material de estudio del trabajo.
3. Se detectaron cantidades, estadísticamente significativas, más elevadas de exosomas en plasma que en LBA tanto en pacientes con enfermedad oncológica como sin ella.
4. Se obtuvo una mayor concentración de exosomas en muestras de LBA y de plasma en pacientes tumorales con respecto a pacientes sin patología oncológica.
5. Específicamente en muestras de LBA se aisló una mayor cantidad de exosomas en las obtenidas en pacientes con cáncer de pulmón.
6. Se encontró una menor expresión de proteínas de membrana exosomal en muestras de LBA que en muestras plasmáticas.
7. Respecto del contenido de los exosomas, se objetivó una mayor carga de miARNs exosomales en ambos tipos de muestras en pacientes con cáncer de pulmón.
8. En pacientes oncológicos encontramos más miARNs con elevados niveles en muestras de plasma que en LBA. Por el contrario, en pacientes sin patología tumoral encontramos más miARNs con elevados niveles en el LBA que en las muestras de plasma.

9. Entre los miARNs más representados en todas las muestras, los aislados de exosomas de LBA de ambos tipos de enfermos son los que guardan un mayor grado de similitud.
10. El miR-122 se detectó solo en muestras de pacientes con cáncer de pulmón, el miR-126 solo se detectó en exosomas de plasma y miR-302a y miR-302c solo estaban presentes en muestras de LBA.
11. Respecto de las funciones efectoras de los miARNs contenidos en los exosomas, se identificaron varias vías relacionadas con el desarrollo tumoral, incluido el cáncer de pulmón.
12. Al realizar el análisis de proteínas presentes en nuestros exosomas encontramos citoquinas en el interior de los mismos de todos los subgrupos de enfermos y medios.
13. La citoquina más sobreexpresada fue el TGF2a. Las citoquinas GDFN y BDFN están presentes en exosomas de todos los subgrupos. NAP-2 fue específica de exosomas de plasma de pacientes con cáncer de pulmón. RANTES fue expresada solo en exosomas de pacientes sin patología tumoral.
14. Los niveles de exosomas o de miARNs contenidos en los exosomas aislados de plasma y/o LBA, no se relacionaron con pronóstico, repuesta al tratamiento o supervivencia de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004. Update 2008. Geneva: *World Health Organization*.
2. Travis WD, Lubin J, Ries L, *et al*. United States lung cancer incidence trends. *Cancer* 1996; 77:2464.
3. Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, *et al*. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 2074-2082.
4. Sekido Y, Fong KM, Minna JD: Molecular genetics of lung cancer. *Annual Review of Medicine* 2003; 54: 73-87.
5. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, *et al*. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non small cell lung cancer. *N Engl Med* 2002; 346:92-98.
6. Meyerson M, Franklin WA, Kelley MJ: Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Seminar in Oncology* 2004; 31 (suppl 1): 4-19.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, *et al*. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2001; 61:69
8. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:10
9. Instituto Nacional de Estadística: defunciones según la causa de muerte en España 2010. Madrid, 2012. Disponible en URL: <http://www.ine.es>
10. Youlten DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol*. 2008; 3:819-831
11. Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *Int J Cancer*. 2010; 126:1454-1466.
12. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, *et al*. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:1672-1694.
13. Peto R, Lopez AD, Boreham J, *et al*. Mortality from smoking in developed countries 1950-200. 2nd ed. Revised June 2006. Available at:http://www.wtsu.ox.ac.uk/Tobacco/SMK_All_PAGES.pdf. International Union against Cancer (UICC) 2006: Geneva: Switzerland.
14. Weiss W. Cigarette smoking and lung cancer trends. A light at the end of the tunnel? *Chest*. 1997; 111:1414-1416.

15. Harris JE: Cigarette smoking among successive birth cohorts of men and women in the United States during 1900-80. *J Natl Cancer Inst.*1983; 71; 73-479.
16. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011.
17. Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, *et al.* Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs: *Int J Cancer.* 2005; 116:963-971.
18. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* 2003; 362:847-852.
19. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, *et al.* Cancer incidence in five continents. Vol VIII. IARC Scientific Publications n° 155 Lyon; 2002.
20. Gibbons FK, Brabda JA, Shepard JA. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 122006.A 37 year-old man with haemoptysis and a pulmonary infiltrate. *N Engl J Med* 2006; 354:1729-37.
21. Henschke CI, Yankelevitz DF, McCauley DI *et al.* Guidelines for the use of spiral computed tomography in screening for lung cancer. *Eur Respir J* 2003; 21 (Suppl. 39):45S-51S.
22. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF *et al.* Early lung cancer action Project: Overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354:99-105.
23. Mulshine JL, Sullivan DC, *et al.* Lung cancer screening. *N Engl J Med* 2005; 352:2714-20.
24. Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM *et al.* Survival of patients with stage I lung cancer detected don CT screening. *N Engl J Med* 2006; 355 (17): 1763-71.
25. National Lung Cancer Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, *et al.* Reduced lung- cancer mortality with low dose computed topographic screening. *N Engl J Med* 2011; 365:395.
26. Chanin TD, Merrick DT, Franklin WA, *et al.* Recent developments in biomarkers for the early detection of lung cancer: perspectives based on publications 2003 to present. *Curr Opin Pulm Med.* 2004 Jul;10(4):242-7. Review.
27. Scagliotii G. Symptoms, signs and staging of lung cancer. *Eur Respir Mon.* 2001; 17:86-119.

28. Smith EL, Hann D; Ahles TA, *et al.* Dyspnoea, anxiety, body consciousness, and quality of life in patients with lung cancer. *J Pain Symptom Manages.* 2001; 21:323-9.
29. Chute CG, Greenberg ER, Baron J, *et al.* Presenting conditions of 1539 population-base lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancer.* 1985; 56:2107-11.
30. Patel A, Davila DG, Peters CG. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clin Proc.*1993; 68:278-87.
31. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK. Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, IARC, Lyon, France 2004.
32. Yang Y; Iwanaga K, Raso MG, *et al.* Phosphatidylinositol-3-kinase mediates bronchovascular stem cell expression in mouse models of oncogenic K-ras induced lung cancer. *PloS Science ONE* 2008;3(5):e220
33. Garbe ME, Troyanskaya OG, Schloens K, *et al.* Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci US* 2002;59; 1090
34. Battacherjee A, Richards WG, Staunos J *et al.* Classification of human lung carcinomas by miRNAs expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci US* 2001; 98:13790-5.
35. Nakhosteen J. Removal of tracheobronchial foreign body. Gustav Killian. An actual translation of the first paper by Gustav Killian. *J Bronchol* 1994, 1:76
36. Sauret J. Cien años de neumología 1900-2000.SEPAR. Ediciones Aula Médica 1998.
37. Bourgeois H, Lenormant CH. Tratado de Patología Quirúrgica. Manuel Publi Ed, Valencia 1908.
38. García del Real E. Historia contemporánea de la Medicina. Espasa Calpe, SA. Madrid 1934.
39. Atkins JP. Bronchology: The Philadelphia Legacy. *Journal of Bronchology* 1996; 3(4): 328-30.
40. Holinger PH. Chevalier Jackson MD. *Dis of the Chest* 1959; 36: 567-9.
41. Ikeda S, Yanai N, Ishikawa S. Flexible bronchofiberscope. *Keipo J Med* 1968; 17: 1-18.
42. Ikeda S. Atlas of flexible bronchofiberscopy. University Park Press. Baltimore and London 1974.

43. Finley TN, Swenson EW, Curran WS, *et al.* Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann Intern Med* 1967; 66: 651-8.
44. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from humans by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1978; 84: 559-73.
45. Wimberly N, Faling LJ, Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:337-343.
46. Mori K, Yanase N, Kaneko M *et al.* Diagnosis of peripheral lung cancer in cases of tumours 2 cm or less in size. *Chest* 1989; 95:304-308.
47. Anderson H, Fontana RS, Harrison EG. Transbronchoscopic lung biopsy in diffuse lung disease. *Dis Chest* 1965; 48:187-192.
48. Levin DC, Wicks AB, Ellis JH: Transbronchial lung biopsy via fiberoptic brochoscope. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110:4-12.
49. Descombes E, Gardiol D, Leuenberger P. Transbronchial lung biopsy. An analysis of 530 cases with reference to the number of samples. *Monaldi Arch Dis* 1997;52:324-329.
50. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from lungs y bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84:559-573.
51. Daniele RP, Altose MD, Roland DT. Immunocompetent cells from the coger respiratory tract of normal human lungs: *J Clin Invest* 1975; 56:986-995.
52. Castella J, Puzo C. Lavado broncoalveolar. Aportaciones a la clínica. En: Benlloch E, editor. Libro del año. Neumología. Madrid: Saned, 1992; 115-138.
53. European Society of Pneumology Task Group on BAL. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1989; 2: 561-585.
54. European Society of Pneumology Task Group on BAL. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1990; 3: 937-974.
55. Helmers RA, Pisani RJ. Bronchoalveolar lavage. En: Prakash UBS, editor. *Bronchoscopy*. Nueva York: Raven Press Ltd., 1994; 155-182.
56. Helmers RA, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage. En: Wang KP, Metha AC, editores. *Flexible bronchoscopy*. Cambridge: Blackwell Science 1995; 160-194.
57. Klech H, Hutter C, Costabel U. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir Rev* 1992; 2: 8.

58. Normativa sobre la práctica del lavado broncoalveolar. Recomendaciones SEPAR no 8. Barcelona: Doyma Ed., 1989.
59. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. En: Feinsilver SH, Fein AM, editores. Textbook of bronchoscopy. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995; 49-57.
60. Bellmunt J, De Gracia J, Morales S, *et al.* Cytologic diagnosis in bronchoalveolar lavage specimens. *Chest* 1990; 98: 513-514.
61. Castella J, Puzo C, Mota S. Algunos avances en broncoscopia. En: Actualizaciones SEPAR. Vol. 2. Barcelona: Prous Science, 1996; 241-262.
62. De Diego A, Compte L, Sanchis J, *et al.* Usefulness of carcinoembryonic antigen determination in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1991; 100: 1060-1063.
63. De la Cruz Ríos J, Pacheco Galván A, Sanz I, *et al.* Lavado broncoalveolar. Estudio de la celularidad y proteínas de grupos de población normal. *Med Clin (Barc)* 1984; 83: 842-848.
64. Martín Juan J, Valenzuela Mateos F, Soto Campos G, *et al.* Estudio de calidad y selección de muestras de lavado broncoalveolar (LBA) en neumopatías difusas. *Arch Bronconeumol* 1996; 32: 332-340.
65. Ong TH, Eng P: Massive hemoptysis requiring intensive care. *Intensive Care Med* 2003; 29:317-320.
66. Raghu G, Collard HR, Egan JJ. An oficial ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 788-824.
67. Ragu G, Weycker D, Edelsberg J *et al.* Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:810-816.
68. Navaratman V, Fleming KM, Est J *at el.* The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the UK. *Thorax* 2011; 66:462-467.
69. Flaherty KR, Andrei AC, King JR *et al.* Idiopathic interstitial pneumonia: Do Communicaty and academia physicians agree on diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1054-1060.
70. Lee JJ, Liu D, Lee JS *et al.* The long term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1081-88.
71. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984; 44:4217-4223.

72. Zöchbauer-Müller A, Minna J, Molecular changes in lung carcinogenesis. *Amer Soc Clin Oncol*.2002 Educational Book: 349-354.
73. Sherr CJ, Cancer cell cycles. *Science* 196; 274:1672-1677.
74. Carretero J. Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. Cáncer de pulmón. Curso de la ESO en español. 17-18 febrero 2005.
75. Brody JS, Spira A. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation and lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006; (3): 535-538.
76. Ara S, Lee PS, Hansen MF, *et al.* Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Research* 1990; 18:4961.
77. Hollstein M, Sidransky D, Volgellstein B, *et al.* P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
78. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J *et al.* Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2001; 34 (supple 2): S53-S58.
79. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1999; 118(6):1136-1152.
80. Burke L, Flieder DB, Guinee DG *et al.* Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(1): 232-241.
81. Rom WN, Hay JG, Lee TC, *et al.* Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161(4 Pt 1): 1355-1367.
82. Sánchez-Céspedes M. Dissecting the genetic alterations implicated in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 2003; 40 (2):111-21.
83. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139
84. Páez JG, Janne PA, Lee JC, *et al.* EGFR mutations in lung cancer. Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-1500.
85. Pao W, Milller V, Zakowski M, *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancer from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13306-13311.

86. Sordella R, Bell DW, Haber DA, *et al.* Gefitinib-sensitivity EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305:1163-1167.
87. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, *et al.* Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:339-346.
88. Taron M, Ichibise Y, Rossel R, *et al.* Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5878-85.
89. Gazdar AF; Minna JD. Inhibition of EGFR signalling: All mutations are not created equal. *PLoS Med* 2005; 2:e377.
90. Zhong S, Fields CR, Ju N, *et al.* Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone decetylation in lung cancer. *Oncogene* 2007; 26:2621-2634.
91. Rauch T, Zhong X, Wu X, *et al.* High-resolution mapping of DNA hypermethylation nd hipomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2008; 105: 252-257.
92. Shame DS, Girad L, Gaob B, *et al.* A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006; 3:E486.
93. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR *et al.* Aberrant patterns os DNA Methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:687-692.
94. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142:241-243.
95. Tan EM, Schur PH, Carr RI, *et al.* Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966, 45:1732-1740.
96. Koffler D, Agnello V, Winchester R, *et al.* The ocurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 1973; 52: 198-204.
97. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, *et al.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.
98. Fournie GJ, Martres F, Pourrat JP, *et al.* Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology* 1993, 39: 215-221.

99. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, *et al.* Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-2120.
100. Silva J.M, Dominguez J, Silva JM. Garcia A, *et al.* Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics, *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2821-2825.
101. Anker P, Stroun M. Tumor-related alterations in circulating DNA, potential for diagnosis, prognosis and detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):289-91
102. Stroun M, Anker P. In vitro synthesis of DNA spontaneously released by bacteria or frog auricles. *Biochimie* 1972; 54: 1443-1452.
103. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res.* 1976 Aug;36(8):2832-9.
104. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res* 1975, 35: 2375-2382.
105. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, *et al.* Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1527-1532.
106. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, *et al.* K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997, 1112: 1114-1120.
107. Taback B, Hoon DS. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1022: 1-8.
108. Silva JM, Garcia JM, Dominguez G, *et al.* Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 71-76.
109. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, *et al.* Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999, 5: 1961-1965.
110. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, *et al.* Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, 3: 67-71.

111. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791.
112. Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665.
113. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, *et al.* Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998; 17: 89-97.
114. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 1999, 256: 42-49.
115. Lo KW, Lo YM, Leung SF, *et al.* Analysis of cell-free Epstein-Barr virus-associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chem* 1999; 45:1292-4.
116. Rykova EY, Wunsche W, Brizgunova OE, *et al.* Concentrations of circulating RNA from healthy donors and cancer patients estimated by different methods. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 328-33.
117. Rajagopal C, Stone KL, Mains RE, *et al.* Secretion stimulates intramembrane proteolysis of a secretory granule membrane enzyme. *J Biol Chem.* 2010; 285: 34632-42.
118. Rosi A, Guidoni L, Luciani A.M, *et al.* RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 1988; 39: 153-160.
119. Barz D, Goppelt M, Szamel M, *et al.* Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb). *Biochim Biophys Acta.* 1985; 814: 77-84.
120. Carr JM, Dvorak AM, Dvorak HF. Circulating membrane vesicles in leukemic blood. *Cancer Res* 1985; 45: 5944-5951.
121. Komatsu T, Arashiki N, Otsuka Y, *et al.* Extrusion of Na,K-ATPase and transferrin receptor with lipid raft-associated proteins in different populations of exosomes during reticulocyte maturation in dogs. *Jpn J Vet Res.* 2010; 58: 17-27.
122. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-659.

123. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*.116(2):281-297.
124. Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 6(5):376-385.
125. Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev*. 20 (7): 1993-1997.
126. Yainaiihara N, Caplen N, Bowman E, *et al*. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-98
127. Lu J, Getz G, Miska EA, *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834-8
128. Chen X, Ba Y, Ma L, *et al*. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18:997-1006.
129. Garcia JM, Garcia V, Peña C, *et al*. Extracellular plasma RNA from colon cancer patients is confined in vesicle-like structure and its mRNA-enriched. *RABN* 2008; 14:1424-32.
130. Chen X, Chen X, Ba Y, *et al*. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008.
131. Lodes MJ, Caraballo M, Suciú D, *et al* . Detection of cancer with serum miRNAs on oligonucleotide microarray, *PloS One* 2009; 4:e6629.
132. Seller A, Leidinger P, Borries A, *et al*. miARNs in lung cancer-studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 2009;9: 353.
133. Hu Z, Chen X, Zhao Y, *et al*. Serum microRNAs signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profile predict survival of non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:1721-6).
134. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 2005; 92:305-11.
135. Garcia JM, Gacrá V, Peña C, *et al*. Extracellular plasma RNA from colon cancer patients is confined in a vesicle-like structure and is mRNA-enriched. *RNA* 2008; 14:1424-1432.
136. Hugel B, *et al*. 2005 Hugel, B. *et al*. (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* (Bethesda) 2005; 20, 22-27 24.

137. Thery C, Ostrowski M, Segura E; Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 581-593.
138. Trams EG; Lauter CJ; Salem N. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles. *Biochim Biophys. Acta* 265, 1981; 63-70.
139. Harding C, Heuser P, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97, 1983; 329-339.
140. Pan BK, Tng K, Wu C, *et al.* Electron microscopic evidence for externalization of the transferring receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 101 1985; 942-948.
141. Johnstone RM, Adam M Hammond JR. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with release vesicles (exosomes) *J. Biol Chem* 262, 1987; 9412-9420.
142. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles *J Exp Med* 183, 1996; 1161-1172.
143. Tranjkovic K, Hsu C, Chiantia S, *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 2008; 1244-1247.
144. Valadi H Ekstrom K, Bossios A. Exosome-mediated transfer of mRnas and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat cell Biol* 9 2007; 654-659.
145. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-1476.
146. Nolte-'t Hoen ENM, Buermans HPJ, Waasdorp M, *et al.* Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 9272-9285.
147. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, *et al.* Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun.* 2011 Feb 1;2:180. doi: 10.1038/ncomms1180
148. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 2012; 21: R125-1
149. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, *et al.* Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17: 879-887.

150. Silva J, Garcia V, Rodriguez M, Compte M, *et al.* Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 409–418. Silva *et al* 2012,
151. Soldevilla B, Rodríguez M, San Millán C, *et al.* Tumor-derived exosomes are enriched in Δ Np73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 467
152. Rodríguez M, Silva J, Herrera A, Herrera M, *et al.* Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 40575–40587.
153. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, *et al.* Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4: 416–425.
154. Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M *et al.* Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 13–23.
155. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011; 9: 9
156. Andre F, Scharzt NEC, Movassagh M, Flament *et al.* Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002; 360: 295–305.
157. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011; 9: 9.
158. Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, *et al.* Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 528–533.
159. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, *et al.* Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol* 2008; 79: 12–17.
160. Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-Deleon PA. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1627–1636.
161. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, *et al.* Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE* 2013; 8: e58502.

162. Bretz NP, Ridinger J, Rupp A-K, Rimbach K, *et al.* Body fluid exosomes promote secretion of inflammatory cytokines in monocytic cells via Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2013; 288: 36691–36702.
163. Tokuhisa M, Ichikawa Y, Kosaka N, Ochiya T, *et al.* Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS ONE* 2015; 10: e0130472.
164. Chiasserini D, van Weering JRT, Piersma SR, Pham TV, *et al.* Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 2014; 106: 191–204.
165. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3809–3814.
166. György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, *et al.* Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS ONE* 2012; 7: e49726.
167. Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, *et al.* Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J* 2003; 22: 578–583.
168. Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, López-Muñiz MB, *et al.* Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 713–724.
169. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, *et al.* Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol* 2011; 2: 215–222.
170. Kang C-S, Ban M, Choi E-J, Moon H-G, *et al.* Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PLoS ONE* 2013; 8: e76520.
171. Dutta S, Reamtong O, Pangvongsa W, Kitdumrongthum S, *et al.* Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2015. doi:10.1016/j.bbadis.2015.06.024
172. Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, *et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 7290–7304.

173. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 575–581.
174. Olga Moreno-Gonzalo. *Frontiers in immunology* 2014
175. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–289.
176. Savina A, Vidal M, Colomo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rb11. 2002; *J Cell Sci* 115: 2505-2515.e
177. Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 69–77.
178. Ostrowski, M., Carmo , N. B., Krumeich S, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*. 12, 19-30
179. Bobrie A, Krueuch S, Reya F, Recchi C, *et al.* Rab 27^a supports exosome-dependent and independent mechanisms tha modif. The tumor microenvaronment and can promte tumor progresión *Cancer Research*, 72 4920-4930.
180. Hsu C, Mrohashi y, Yoshimura S, Manrique- Hoyos N, *et al.* Regultaion of exosome secretion by Rab35 and its GTPaase-activating proteins TBC1D10A-C *The Journal of Cell Biology*, 189, 223-232.
181. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–289.
182. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 328–335.
183. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985; 101: 942–948.
184. Al- Nedawi K, Meehn B, Rk J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor porgression. *Cell Cycle* 2009; 8:2014-18.
185. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010; 73: 1907–1920.

186. Staubach S, Razawi H, Hanisch P. Proteomics of MUC1 containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF7. *Proteomics* 9 (10) 2009; 2820-2835.
187. De Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 2003; 102: 4336-4344
188. Mathivanan, S, H. Ji, and R J Simpson, Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication *J Proteomics*
189. Futter CE, White IJ. Annexins and endocytosis. *Traffic* 2007; 8: 951-958
190. Gastpart R, Gehrman M, Bausaro MA, Assa A, *et al.* Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; 85: 5238-5247.
191. Valadi H Ekstrom K, Bossios A. Exosome-mediated transfer of mRnas and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9 (2007) 654-659.
192. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110 (1) 2008 13-21.
193. Schorey, J.S. and Bhatnagar, S. 2008 .Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9, 871-881,
194. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes:extracellular organelles important in intercelular communicatio. *J Proteomics* 73 (10) 2010. 1907-1920.
195. Prado N, Marazuela EG; Segura H: Exosomes from bronchialalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction *J Immunol.* 181: 1519-1525 2008
196. Bianco, F. *et al.* (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 b release from microglia. *J. Immunol.* 174, 7268-7277.
197. Bellingham, Rajedran L, Honsho M, Zahn TR *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 103: 11172-1117 2006.
198. Chivet M, Javalet C, Hemming F, Pernet-Gallay K, *et al.* Exosomes as a novel way of interneuronal communication.. *Biochem Soc Trans.* 2013 Feb 1;41(1):241-4. doi: 10.1042/BST20120266. Review.
199. Stegmayr B, G. Ronquist Promotive effect on human sperm progressive motility by proteasomes. *Urol Res* 1982;10: 253-257

200. Lai RC, Aíslan F, Lee MM, *et al.* Exosomes secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4:214-22
201. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem (Tokyo)* 2006; 140: 13-21.
202. Andre F, Scharzt NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P *et al.* Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002; 360: 295-305.
203. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128: 1796-1804.
204. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4:594-600.
205. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 2002; 160, 673-680.
206. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 2008;10, 1470-1476.
207. Kim, J.W. *et al.* Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2005;11, 1010-1020.
208. Albanese, J. *et al.* Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood* 1998; 91, 3862-3874.
209. Shedden, K. *et al.* Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003; 63, 4331-4337.
210. Finley TN, Swenson EW, Curran WS, Huber GL, Laman AJ. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann Intern Med* 1967; 66: 651-8.
211. Danel C, Isrsel-Biet D, Costabel U, Wallaert B and Klech H. The clinical role of BAL in rare pulmonary diseases. *Eur Respir Rev* 1992; 2: 83-88.
212. Rennard SI. Assessment of the clinical value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer in the lung. *Eur Respir Rev* 1992; 2: 100-105.

213. Bianchi DW, Wataganara T, Lapaire O. Fetal nucleic acids in maternal body fluids: an update. *Ann N Y Acad Sc* 2006; 1075:63-73
214. Angert RM, Leshane ES, Yarnell RW Cell-free fetal DNA incerebrospinal fluid during the peipartum period. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1087-1090
215. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J: Shedding micovesicles: artefacts no more. *Trend Cell Biolo* 19:43-51
216. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K *et al.* Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:808-818.
217. Mack M, Kleinsthmidt A, Brühl H *et al.* Transfer of the chemokine CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000; 6:769-775
218. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Nov; 36: 888-906.
219. Testa JS, Apcher GS, Comber JD, Eisenlohr LC. Exosome-driven antigen transfer for MHC class II presentation facilitated by the receptor binding activity of influenza hemagglutinin. *J Immunol.* 2010; 185: 6608-16.
220. Sharrow S O, Mathieson B J, Singer A. Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras. *J. Immunol.* 1981; 126: 1327-1335.
221. Davis, D. M. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nature Rev. Immunol* 2007; 7: 238-243
222. Khaleda R, Torregosa P, Dahlberg B. Proinflammatory exosomes in bornchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* 2010; 65:106-1024
223. Prado N, Marazulea EG, Segura E *et al*: Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction *J Immunol* 2008; 1519-25
224. Bathnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ. Exosomes released from macrophages infected with intacellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110:3234-44
225. Admyre C, Telemo E, Almquistm. Exosomes-nanocvssciles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63: 404-408

226. Cinti R, Diou J, Belanger D. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 338:21-30.
227. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Membrane-associated Hsp72 From tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 120 457:471 2010
228. Silva J, Garcia V, Zaballo A, Provencio M, Lombardia L, Almonacid L, Garcia JM, Dominguez G, Peña C, Diaz R, Herrera M, Varela A and Bonilla F. 2011. Vesicle-related microRNAs in plasma of non small cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 37: 617-623.
229. King HW, Michale MZ, Gleadow JM 2012: Hypoxic enhancement of exosomes release by breast cancer cells. *BMC cancer* 12: 421
230. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A. 2010. Let 7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 5:e13247
231. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2011) Exosomes/Microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 33:441-454
232. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21:575-581
233. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med* 2013
234. Filipazzi P, Burdell M, Villa A, Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol* (2012)
235. Vlassov A, Magdaleno S, Setterquist R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 2012
236. Kharazina P, Ceder S, Li Q. Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta* 2012
237. Perez-Hernández D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I *et al.* The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries to exosomes.
238. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 *Experi Cell research* 2000; 1584-92

239. Hays GL, Lippman SM, Flaitz CM. Co-carcinogenesis and field cancerization: oral lesions offer first signs. *J Am Dent Assoc* 1995; 126:47-51
240. Chambers MS, Jacob RJ. How carcinogens cause cancer. *Text Dent J* 1994; 111:13-9
241. Keller S, Ridinger J, Rupp AK. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnosis. *Journal of Translational Medicine* 2011; 9:86
242. Azmi AS, Voa B, Sarkar F Exosomes in cancer development, metastasi, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Mestatais Rev*
243. Ma C, Liu Y, He L. MicroRNAs-powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci* 2009; 52:323-30
244. Lagos- Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W. 2001 Identification of novel genes coding for small expressed RNAs: *Science* 294(5543):853-858.
245. Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834-8
246. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75:843-54
247. Lee R, Ambros V (2001) An extensive class of smallRNAs in Caenorhabditis elegans. *Science*. 294(5543):862-864.
248. miRBase: tools for microRNA genomics. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. *NAR* 2008 36:D154-D158
249. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. *NAR* 2006 34:D140-D144
250. Esquela- Kerscher A, Slack FJ .Oncomirs-microRNAs with a role in cance: *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259-269.
251. Mitchell PS. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 105:10513-18
252. Chen X, 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and others diseases. *Cell Res* 18:997-1006
253. Patnaiak SK, Kannisto E, Knudsen S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stagi I non-small cell lunf cancr after surgical resection. 2010; *Cancer Res* 70:36-45

254. Landi MT. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* ; 2010;16:430-441
255. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W and Cui Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008; 3: e3420.
256. Zhen-Ya L, Yang X, Wen-Nan Z, Chao Z, *et al.*. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 α . *J Hepatol* 55: 2011; 602-611.
257. Köberle V, Kronenberger B, Pleli T, Trojan J, *et al.* Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2013. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.002.
258. Ren G and Kang Y. A one-two punch of miR-126/126* against metastasis. *Nat Cell Biol* 2013; 5:231-233.
259. Sun D, Zhuang X, Zhang S, Deng ZB, *et al.* Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Mar;65(3):342-7
260. Wang W, Peng B, Wang D, Ma X, Jiang D, *et al.* Human tumor microRNA signatures derived from large-scale oligonucleotide microarray datasets. *Int J Cancer* 2011; 129: 1624-1634.
261. Guo Y, Ying L, Tian Y, Yang P, *et al.* miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *FEBS J* 2013; 280:4531-4538.
262. Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008; 10: 2115-2124.
263. Lipchina I, Studer L and Betel D. The expanding role of miR-302-367 in pluripotency and reprogramming. *Cell Cycle* 2012; 11:1517-1523.
264. Subramanyan D, Lamouille S, Judson RL. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblast to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29:443
265. Card A, Hebbard PB, Li L. Oct4/Sox2 regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol cell Biol* 2008; 28:6426-38
266. Trakooljul N, Hicks JA, Liu HC. Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143. *Anim Genet* 2010; 41 (4): 357-64. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.02015.x. PMID 20064147.
267. Zhang H, Cai X, Wang Y, Tang H, Tong D, Ji F. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses

- tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep*; 2010 24 (5): 1363–9. doi:10.3892/or_00000994. PMID 20878132
268. Kitade Y, Akao Y. MicroRNAs and Their Therapeutic Potential for Human Diseases: MicroRNAs, miR-143 and -145, Function as Anti-oncomirs and the Application of Chemically Modified miR-143 as an Anti-cancer Drug. *J Pharmacol Sci* 2010; 114 (3): 276–80. doi:10.1254/jphs.10R12FM. PMID 20953119.
 269. Chen , Guo X , Zhang1 H, , Xiang Y , *et al.* Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis *Oncogene* 2009; 28, 1385–1392; doi:10.1038/onc.2008.474; published online 12 January
 270. Molin Li, Weiming F, Lulu W, *et al.* mir128 and its targets genes in tumorigenesis and metasatasis *Experimental Cell Research*. 2013; Volume 319, Issue 20, 3059–3064.
 271. Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, *et al.* Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.*, 21 (6) 2005, 1469–1477
 272. Lukiw W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*, 2007; 18 (3) 297–300.
 273. Persengiev S.P., Kondova I. I , Bontrop R. E. The impact of microRNAs on brain aging and neurodegeneration *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.*, 2012 . 359–369.
 274. Volinia S., Calin G. A., Liu C.G., *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (7) 2006; 2257–2261
 275. Roth P., Wischhusen J., Happend C., *et al.* A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J. Neurochem.*, 2011; 118 (3) 449–457
 276. Farazi T.A. ,Spitzer J.I., Morozov P., *et al.* miRNAs in human cancer. *J. Pathol.*, 223 (2) (2011), pp. 102–115
 277. Johnson C.D.; *et al.* The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells". *Cancer Res.* 2007 67 (16): 7713–7722. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1083. PMID 17699775.
 278. Mitchell, P. S.; Parkin, R. K.; Kroh, E. M.; *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008 105 (30): 10513–8. Bibcode:2008PNAS..10510513M. doi:10.1073/pnas.0804549105. PMC 2492472. PMID 18663219.
 279. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, *et al.* DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 40 2012. :W498-504.

280. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, *et al.* MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011. 108: 3713-3718.
281. Zha W, Cao L, Shen Y, Huang M. Roles of Mir-144-ZFX Pathway in Growth Regulation of Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 2013. 8(9): e74175. doi:10.1371/journal.pone.0074175
282. Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, Cordeiro A, *et al.* miR-141 and miR-200c as Markers of Overall Survival in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2014 9(7): e101899. doi:10.1371/journal.pone.0101899
283. Gregory PA, Bert AG, Parterson EL. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2008 139:871-890 2
284. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009 139:871-890.
285. Gere Mayer. "Immunology-Chapter thirteen: Cytokines and immunoregulation". Microbiology and Immunology On-line Textbook. USC School of Medicine. 2006.
286. Jakóbsiak M, Lasek W, Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Let.*2003; 90: 103-122.
287. Prieto Martín A, Arroyo Yustos M, de Portugal Fernández del Rivero T, Álvarez-Mon Soto M. Capítulo 1.4. Inmunología tumoral. En: Díaz-Rubio E, García-Conde J. Oncología clínica básica. Arán Ediciones. 2000.
288. Coffey, R.; Gangarosa, L.; Damstrup, L.; Dempsey, P. Basic actions of transforming growth factor- α and related peptides. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* 1995, 7, 923.
289. Fanelli MF (Aug 2012). "The influence of transforming growth factor- α , cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer". *Histopathology* 61 (2): 153-61. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04139.x. PMID 22582975.
290. Tarhini AA (Jan 2014). A four-marker signature of TNF-RII, TGF- α , TIMP-1 and CRP is prognostic of worse survival in high-risk surgically resected melanoma." *J Transl Med.* 12. doi:10.1186/1479-5876-12-19. PMC 3909384. PMID 24457057.
291. Klein SM, Behrstock S, Mc Hugh J, Hoffmann K, Wallace K, Susuki M, *et al.* GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gen Ther* 2005;16:509-21.

292. Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9771-5.
293. Laing K, Secombes C (2004). «Chemokines». *Dev Comp Immunol* 28 (5): 443-60. doi:10.1016/j.dci.2003.09.006. PMID 15062643.
294. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, and Lusso P (October de 1995). Identification of RANTES, MIP-1a, and MIP-1b as the major HIV-suppressive factor produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815. doi:10.1126/science.270.5243.1811. PMID 8525373.
295. Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, Smith T, Martin G, Ralph P, Sager R (October 1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (19): 7732-6. doi:10.1073/pnas.87.19.7732. PMC 54822. PMID 2217207.
296. Izuhara K, Arima K, Yasunaga S (2003). «IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies.». Current drug targets. *Inflammation and allergy* 1 (3): 263-9. PMID 14561191.
297. Dessein A, Kouriba B, Eboumbou C, *et al.* (2005). Interleukin-13 in the skin and interferon-gamma in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201: 180-90. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00195.x. PMID 15361241.
298. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333 (6173): 571-3. Bibcode:1988Natur.333..571N. doi:10.1038/333571a0. PMID 3259677.
299. Zhang HG, Grizzle W. Exosomes and cancer. A Newly described pathway of immune suppression *Clin Cancer Res*
300. Thery C, Ostrowski, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Natural Reviews*
301. Greening DW, Gopal SK, Simposn RJ. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell dev Biol* (2015)
302. Deregibus, M.C. *et al.* (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440-2448
303. Tan A, De La Peña H, Seifalian AM. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine*. 2010 Nov 10;5:889-900.

304. Scheerlinck JP, Greenwood DL. Virus-sized vaccine delivery systems. *Drug Discov Today*. 2008 Oct;13(19-20):882-7.
305. Rieger J, Freichels H, Imberty A, Putaux JL, Delair T, Jérôme C, Auzély-Velty R. Polyester nanoparticles presenting mannose residues: toward the development of new vaccine delivery systems combining biodegradability and targeting properties. *Biomacromolecules*. 2009 Mar 9;10(3):651-7.

